

Analyse der zellulären Proteine
der peripheren menschlichen Lymphozyten
mit der zwei-dimensionalen Elektrophorese

Nachweis genetisch determinierter
Variationen

Dorothea Waldinger

Analyse der zellulären Proteine
der peripheren menschlichen Lymphozyten
mit der zwei-dimensionalen Elektrophorese

Nachweis genetisch determinierter Variationen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Dorothea Waldinger
aus Neuötting

München, Oktober 1986

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Cleve

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Bohn

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.1986

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	9
1.1. <u>Die Methode der zwei-dimensionalen Elektrophorese</u>	9
1.2. <u>Anwendungen der 2-DE</u>	12
1.2.1. Genetische Variabilität und Polymorphismen bei zellulären Proteinen	12
1.2.2. Differenzierung von Lymphozyten	14
1.3. <u>Problemstellung der Arbeit</u>	16
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. <u>Material</u>	19
2.1.1. Genetisch nicht-verwandte Blutspender	19
2.1.2. Familien	19
2.1.3. Monozygote Zwillinge	19
2.1.4. Lymphoblastoide Zelllinien	20
2.2. <u>Zellkultur</u>	21
2.2.1. Blutentnahme	21
2.2.2. Lymphozytenisolierung	21
2.2.3. Lymphozytenkultivierung	22
2.2.4. Mitogenstimulierung	23
2.2.5. Immunfluoreszenztests	25
2.2.6. Kultivierung der lymphoblastoiden Zelllinien	27
2.3. <u>Metabolische Markierung der Zellen</u>	28
2.3.1. Metabolische Markierung mit ^3H -Leucin	28
2.3.2. Metabolische Markierung mit ^3H -Galaktose und ^3H -Fucose	29

2.4.	<u>Zellpräparationen</u>	30
2.4.1.	Zellysate	30
2.4.2.	Cytosolische Proteine	31
2.4.3.	Triton X-100 Extrakte	31
2.5.	<u>Zwei-dimensionale Elektrophorese</u>	32
2.5.1.	Isoelektrische Fokussierung	32
2.5.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.5.3.	Bestimmung der isoelektrischen Punkte und der Molekulargewichte der Proteine	37
2.6.	<u>Sichtbarmachung der Proteine</u>	40
2.6.1.	Silberfärbung	40
2.6.2.	Fluorographie	41
2.7.	<u>Auswertung der 2-DE Muster</u>	42
3.	ERGEBNISSE	43
3.1.	<u>Zellstimulierung und Markierung</u>	43
3.1.1.	Mikroskopische Beobachtungen an den Zell- kulturen	43
3.1.2.	Lymphozytenpopulationen in den unstimulier- ten und mitogenstimulierten Kulturen (Immunfluoreszenztest)	44
3.1.3.	Immunfluoreszenzergebnisse bei den lympho- blastoiden Zelllinien	45
3.1.4.	Effektivität der metabolischen Markierung	46
3.2.	<u>2-DE Muster der zellulären Proteine: Metho- dische Aspekte der 2-D Analyse</u>	48
3.2.1.	Nomenklatur der Proteine des 2-DE Musters	48
3.2.2.	Das Auflösungsvermögen der 2-D Elektrophorese	51
3.2.3.	Reproduzierbarkeit des 2-D Proteinmusters bei multiplen Analysen eines Zellpräparates	53

3.3.	<u>Vergleich der 2-DE Muster bei Silberfärbung und Fluorographie</u>	59
3.4.	<u>Veränderungen im 2-D Proteinmuster nach Mitogenstimulierung der Lymphozyten</u>	68
3.4.1.	Vergleich der 2-D Muster von unstimulierten und mitogenstimulierten Lymphozyten nach Silberfärbung	68
3.4.2.	Vergleich der 2-D Fluorogramme der ^3H -Leucin markierten Proteine PHA- und PWM-stimulierter Lymphozyten	74
3.4.3.	2-D Fluorogramme von ^3H -Leucin markierten Lymphozyten in Abhängigkeit von der PHA-Konzentration	79
3.4.4.	Vergleich der 2-D Fluorogramme von LPS-behandelten und PHA-stimulierten Lymphozyten	84
3.5.	<u>Vergleich des 2-D Musters von PHA-stimulierten Lymphozyten und EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien</u>	86
3.6.	<u>Individuelle Unterschiede im 2-D Muster zellulärer Proteine</u>	93
3.6.1.	Quantitative individuelle Unterschiede	93
3.6.2.	Qualitative individuelle Unterschiede	94
3.6.3.	Konstanz der 2-D Muster	105
3.7.	<u>Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede</u>	109
3.7.1.	Frage der geschlechtsspezifischen Unterschiede	109
3.7.2.	Frage der altersspezifischen Unterschiede	109
3.8.	<u>Analyse genetischer Polymorphismen bei zellulären Proteinen menschlicher Lymphozyten</u>	110
3.8.1.	Familienuntersuchungen	110

	Seite
3.8.2. Monozygote Zwillinge	146
3.9. <u>Populationsgenetische Untersuchungen</u>	150
3.10. <u>Charakterisierung der zellulären Proteine</u>	159
3.10.1. Identifizierung von cytosolischen Proteinen	159
3.10.2. Darstellung der Triton X-100 extrahierbaren Proteine	162
3.10.3. Differenzierung von Proteinen und Glykoproteinen	166
4. DISKUSSION	167
4.1. <u>Erhöhung der Syntheserate von Proteinen nach Mitogenstimulierung der Lymphozyten</u>	167
4.2. <u>Identifizierung von T- und B-Zell spezifischen Proteinen</u>	171
4.2.1. Stimulierung der peripheren Blutlymphozyten mit verschiedenen Mitogenen	171
4.2.2. Unterschiedliche Ausprägung von Proteinen bei PHA-stimulierten Lymphozyten und EBV-transformierten Zelllinien	173
4.3. <u>Fehlen von geschlechtsspezifischen Unterschieden</u>	176
4.4. <u>Individuelle Variationen im 2-D Proteinmuster</u>	177
4.4.1. Individuelle Variationen ohne erkennbaren Vererbungsmodus	177
4.4.2. Genetische Polymorphismen	178
4.4.3. Häufigkeit von individuellen qualitativen Variationen bei zellulären Proteinen	184

	Seite
5. ZUSAMMENFASSUNG	188
6. LITERATURVERZEICHNIS	191
Dank s a' g u n g e n	204
L e b e n s l a u f	205

ABKÜRZUNGEN

Con A	Concanavalin A
1-D	Ein-dimensional
2-D	Zwei-dimensional
2-DE	Zwei-dimensionale Elektrophorese
EBV	Epstein Barr Virus
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Hepes	N-2-hydroxyethylendiamin
IEF	Isoelektrofokussierung
Ig	Immunglobulin
LPS	Lipopolysaccharid
MW	Molekulargewicht
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline
PHA	Phythämagglutinin
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PWM	Pokeweed Mitogen
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin

1. EINLEITUNG

1.1. Die Methode der zwei-dimensionalen Elektrophorese

Mit den verschiedenen 1-D Elektrophoresetechniken (IEF in Agarose- oder Polyacrylamidgelen, PAGE, SDS-PAGE) standen zwar schon hochauflösende Methoden für die Trennung von Proteinen zur Verfügung, jedoch war die Zahl der differenzierbaren Proteinbanden noch zu begrenzt, um die Vielfalt von Proteinen, die in zellulären Systemen repräsentiert ist, umfassend analysieren zu können. Die Entwicklung der zwei-dimensionalen Elektrophorese (2-DE) stellte einen Durchbruch in der Analyse solcher komplexer Proteingemische dar. Die heute angewandten 2-DE Techniken basieren hauptsächlich auf der von O'Farrell 1975 entwickelten Methode. Die Grundidee lag in einer Trennung der Proteine nach zwei völlig unabhängigen Parametern. Durch Kombination einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) in der 1. Dimension mit einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in der 2. Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und nach ihrem Molekulargewicht (MW) aufgetrennt. Wegen der hohen Auflösung beider Systeme und der unterschiedlichen Merkmale, nach denen die Trennung der Proteine in den beiden Dimensionen erfolgt, wird eine fast gleichmäßige Verteilung der Proteine über die gesamte Geloberfläche mit einer erheblichen Steigerung des Auflösungsvermögens erreicht. O'Farrell (1975) konnte bei der Trennung von E.coli Proteinen mit der IEF 70 Proteine und mit der SDS-PAGE 100 Proteine differenzieren, während sich mit der 2-DE 1100 Proteine analysieren ließen.

Ein Problem bei der IEF von zellulären Struktur- und Membranproteinen liegt in der Solubilisierung der Proteine. Dieses wurde im O'Farrell - System durch Gegenwart von

Harnstoff und NP-40 in der Proteinprobe und im IEF-Gel gelöst.

Klose (1975) stellte im selben Jahr eine 2-DE Technik vor, die ebenfalls auf dem Prinzip einer Trennung mit IEF und nachfolgender SDS-PAGE beruht, jedoch Modifikationen in der Proteinsolubilisierung und daraus folgend auch in der Zusammensetzung des IEF-Gels enthält.

Im Gegensatz zu den 1-D Techniken kann bei der 2-DE in einem Gel nur eine Proteinprobe aufgetrennt und analysiert werden. Daher müssen meist sehr viele Gele vergleichend ausgewertet werden. Folglich spielt bei der 2-DE die Reproduzierbarkeit eine sehr wichtige Rolle. Um eine größtmögliche Reproduzierbarkeit zu erreichen, entwickelten Anderson und Anderson (1978 a, 1978 b) ein System (ISO-DALT-System), bei dem sowohl bei der IEF als auch bei der SDS-PAGE viele Gele synchron und weitgehend automatisiert gegossen und jeweils parallel 20 Isoelektrofokussierungen bzw. 10 SDS-Gelelektrophoresen in einer Kammer durchgeführt werden können. Dadurch wurde eine optimale Standardisierung und damit eine bestmögliche Reproduzierbarkeit der 2-D Auftrennung und außerdem eine hohe Kapazität für Screening-Programme erreicht. Jedoch scheint der instrumentale Aufwand eines solchen Systems nur für wenige Labors realisierbar zu sein.

Die von O'Farrell beschriebene vertikale 2-DE Technik mit IEF in vertikalen Röhrchengelen und SDS-PAGE in vertikalen Plattengelen wurde in den letzten Jahren auch auf das horizontale Elektrophoresesystem adaptiert (Görg et al. 1981).

Weiterhin sind Variationen im 2-D Trennverfahren beschrieben, bei denen die beiden Dimensionen in umgekehrter Reihenfolge, also SDS-PAGE mit nachfolgender IEF, angewandt werden (Shackelford und Strominger 1980; Shackelford et al. 1981), die sich allerdings kaum durchsetzen konnten.

Die verschiedenen methodischen Prozeduren wurden von Dunn und Burghes (1983 a) in einem Übersichtsartikel ausführlich dargestellt und sollen deshalb hier nicht näher behandelt werden.

Um dem hohen Auflösungsvermögen der 2-DE gerecht zu werden, verwenden die meisten Autoren zur Visualisierung der Proteine weniger Coomassie-Färbungen, sondern vielmehr sensitivere Methoden wie Silberfärbungen oder Autoradiographie bzw. Fluorographie (Dunn und Burghes 1983 b).

Die Komplexität des 2-DE Musters impliziert eine recht mühevollen visuelle Auswertung. Deshalb gingen in den letzten Jahren die Bestrebungen einiger Arbeitsgruppen dahin, Computerprogramme für die Auswertung der 2-DE Muster zu entwickeln (Bossinger et al. 1979; Garrels 1979; Lipkin und Lemkin 1980; Lemkin et al. 1982; Anderson et al. 1981; Taylor et al. 1982; Schneider und Klose 1983; Tyson und Haralick 1986). Dabei verläuft die Bildverarbeitung entweder über ein an den Computer angeschlossenes Photodensitometer oder eine Videokamera. Für quantitative Auswertungen, die nach visueller Analyse nicht zahlenmäßig ausgedrückt werden können, bietet die Computeranalyse offensichtliche Fortschritte. Jedoch sind bei der qualitativen Analyse immer noch Schwierigkeiten mit der Auflösung der Proteinmuster und mit der Transformation der aktuellen Muster in ein digitalisiertes Muster zu verzeichnen, so daß die Qualität der Auswertung nicht an das menschliche Auge heranreichen kann.

1.2. Anwendungen der 2-DE

Die 2-DE fand in den letzten Jahren weitgestreute Anwendungsmöglichkeiten für die Untersuchung verschiedenster biologischer Probleme. Eine detaillierte Beschreibung aller Applikationen der 2-DE würde in diesem Zusammenhang zu weit führen. Nur einige, in der medizinischen und biologischen Forschung aktuelle Themen, die in Bezug auf die Humangenetik relevant erscheinen, sollen kurz aufgeführt werden. Dazu gehören

- 1) die Mutagenitätstestung (Klose 1975; Leavitt und Kakunaga 1980; Marshall et al. 1983),
- 2) die Untersuchung der Genexpression während der Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung (Klose und von Wallenberg-Pachaly 1976; Cullen et al. 1980; Bravo und Knowland 1979; Lester et al. 1981, 1982),
- 3) die Aufklärung der molekularen Veränderungen bei Transformation und Krebs (Bravo und Celis 1980; Thorsud et al. 1982; Tracy et al. 1982 a, 1982 b; Celis et al. 1984),
- 4) die Suche nach der molekularen Basis von genetischen Krankheiten bzw. nach Krankheits-spezifischen oder -assoziierten Markern für die klinische Diagnose (Comings 1979, 1982; Rosenmann et al. 1982; Goldman und Merrill 1984) und
- 5) die Erforschung von genetischer Variabilität und genetischen Polymorphismen bei zellulären Proteinen (Referenzen siehe unter 1.2.1.).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sollen nur zwei spezielle Bereiche einer genaueren Betrachtung unterzogen werden.

1.2.1. Genetische Variabilität und Polymorphismen bei zellulären Proteinen

Genetische Polymorphismen, d.h. die Existenz verschiedener

Allele an einem Genort, sind seit langem bei Enzymen und Serumproteinen bekannt und mit 1-D Elektrophoresetechniken gut untersucht. Die Entwicklung der 2-DE eröffnete nun auch die Möglichkeit, die genetische Variabilität bei zellulären Proteinen zu erforschen. Die genetische Variabilität von Proteinen basiert hauptsächlich auf Aminosäureaustauschen. Da die IEF nicht nur Aminosäureaustausche aufzudecken vermag, die mit einer Ladungsveränderung verbunden sind, sondern auch solche, die mit einer Änderung im isoelektrischen Punkt eines Proteins aufgrund unterschiedlicher Dissoziationskonstanten freier Carboxyl- oder Aminogruppen verknüpft sind, ist diese Methode für die Analyse genetischer Variabilität besonders geeignet.

Genetische Variabilität bei zellulären Proteinen wurde in den letzten Jahren bei verschiedenen species und verschiedenen Organen beschrieben. Dabei stellte v.a. die Maus ein beliebtes Untersuchungsobjekt dar, da hier verschiedene Organe wie Leber, Niere, Muskel oder Gehirn verfügbar sind und außerdem neben Wildpopulationen auch verschiedene Inzuchtstämme für die Analysen zur Verfügung stehen (Racine und Langley 1980 a, 1980 b; Aquadro und Avise 1981; Klose 1982; Klose und Feller 1981; Braun et al. 1985). Beim Menschen sind genetische Variationen im zellulären Proteinmuster mit der 2-DE v.a. an Fibroblasten (Walton et al. 1979; Mc Conkey et al. 1979; Giometti und Anderson 1981; Klose et al. 1983; Goldman et al. 1985) und an Lymphozyten nachgewiesen worden, da sie die am ehesten verfügbaren zellulären Materialien beim Menschen darstellen. Die Untersuchungen über 2-D Polymorphismen bei Lymphozyten beziehen sich auf eine Populationsstudie in Japan (Hamaguchi et al. 1981, 1982 a, 1982 b, 1982 c; Kondo et al. 1984 a, 1984 b, 1985, 1986) und in den USA (Goldman und Merrill 1983). Die Polymorphismen wurden von beiden Arbeitsgruppen an cytosolischen Proteinen PHA-stimulierter Lymphozyten nachgewiesen. Jedoch liegen bisher ausführliche

Familienuntersuchungen, die zum Nachweis der genetischen Basis und zur Klärung des Vererbungsmodus der Proteinvarianten als wesentlich erscheinen, nur von der Arbeitsgruppe von Hamaguchi und Kondo vor.

Die zukünftige Bedeutung der 2-D Polymorphismen ist noch schwer abzuschätzen. Es besteht die große Wahrscheinlichkeit, daß mit der Entdeckung neuer Polymorphismen weitere Abschnitte des Genoms für Kopplungsanalysen und damit für die Kartierung des menschlichen Genoms verfügbar werden (Goldman und Merrill 1984). Weiterhin wurden von Goldman et al. (1982) Anwendungen in der genetischen Beratung diskutiert. Denn eine genetische Kopplung oder eine direkte Assoziation von Polymorphismen mit genetischen Krankheiten wäre denkbar.

1.2.2. Differenzierung von Lymphozyten

Bei der Erforschung der molekularen Veränderungen im Laufe der Zelldifferenzierung kommt den Lymphozyten wegen ihrer wichtigen Funktion bei der Immunabwehr eine besondere Bedeutung zu. Die Ausdifferenzierung von kleinen Lymphozyten zu Antikörper produzierenden Plasmazellen (reife B-Zellen) oder zu reifen T-Zellen (Cytotoxische Zellen, Helfer-Zellen) nach Antigenkontakt geht mit starken morphologischen und metabolischen Veränderungen einher. Die 2-DE bietet die Möglichkeit, die Veränderungen auf der Ebene der zellulären Proteine zu studieren.

In vitro können die Lymphozyten mit Hilfe von Mitogenen polyklonal stimuliert werden. Für die Maus sind spezifische Mitogene für die Stimulierung von T-Zellen (Con A) und B-Zellen (LPS) bekannt (Ling und Kay 1975). Beim Menschen hingegen lassen sich zwar T-Zellen spezifisch mit PHA stimulieren, während kein Mitogen bekannt ist, das

spezifisch menschliche B-Zellen stimuliert. PWM wird meist als polyklonales T- und B-Zell stimulierendes Mitogen beschrieben (Ling und Kay 1975; Waxdal und Basham 1974; Greaves et al. 1974), jedoch konnte Miller (1982) v.a. eine B-Zell stimulierende Wirkung des PWM nachweisen.

Diese methodischen Schwierigkeiten mögen eine Ursache dafür sein, daß bei der Maus spezifische Veränderungen im 2-D Proteinmuster bei der Stimulierung von T- und B-Zellen besser beschrieben sind als beim Menschen. Eine Vielzahl von quantitativen Veränderungen im Proteinmuster nach Stimulierung und eine Reihe T- bzw. B-Zell spezifischer Proteine konnte im Maus-System nachgewiesen werden (Kettman und Lefkovits 1984 a, 1984 b; Braun et al. 1985; Takeda et al. 1983). Beim Menschen sind die Informationen spärlicher gesät. Lester et al. (1981) analysierten die 2-D Muster nach Pulsmarkierung der Proteine im Verlaufe der PHA-Stimulierung und erhielten nur quantitative Unterschiede in zwei Proteinen. Ähnliche Proteinmuster ergab die PWM-Stimulierung. T- und B-Zell spezifische Unterschiede wurden von der selben Arbeitsgruppe (Lester et al. 1982) nur anhand eines Paares einer autologen lymphoblastoiden T- und B-Zelllinie beschrieben. Takeda et al. (1983) konnten bei unstimulierten T- und B-Zellen ebenfalls nur wenige Unterschiede im T- und B-Zellmuster nachweisen.

Erstaunlich erscheint die Tatsache, daß beim Menschen nach Stimulierung der Lymphozyten bisher wesentlich weniger Veränderungen im Proteinmuster beschrieben wurden als bei der Maus, so daß eine weitere Untersuchung als lohnenswert erscheint. Ebenso sollten auch die Fragen geklärt werden, inwieweit PWM beim Menschen B-Zellen zu stimulieren vermag, da bisher in der Literatur gegensätzliche Ergebnisse vertreten werden, und inwieweit eine unterschiedliche Stimulierung sich auf das 2-D Muster ausprägt.

1.3. Problemstellung der Arbeit

In meiner Diplomarbeit wurde mit Hilfe der ein-dimensionalen SDS-PAGE nach geschlechtsspezifischen Unterschieden bei zellulären Proteinen menschlicher EBV-transformierter Zelllinien gesucht. Damals wurden die weibliche Zelllinie BJAB und die beiden männlichen Zelllinien Daudi und Raji, die alle drei aus Burkitt-Lymphomen stammen, untersucht. Nach metabolischer Markierung der Zellen mit ^3H -Leucin, ^3H -Galaktose und ^3H -Fucose wurden zwar Unterschiede im Proteinhinweis in dem Sinne, daß einige Proteinbanden im SDS-Gel bei BJAB fehlten, die bei Daudi und Raji exprimiert waren, beobachtet. Diese Ergebnisse erlaubten jedoch keine definitive Aussage darüber, ob es sich wirklich um geschlechtsspezifische Unterschiede handelte, oder ob diese Variationen als rein individuelle, für die jeweilige Zelllinie spezifische Unterschiede zu interpretieren waren.

Daraus ergab sich für die vorliegende Arbeit zunächst das Problem, geeignetes Material und Methoden zu finden, die eine eindeutige Klassifizierung von geschlechtsspezifischen und individuellen Variationen im zellulären Proteinhinweis ermöglichen.

Da die lymphoblastoiden Zelllinien über lange Zeiträume in Kultur gehalten werden, treten chromosomale Veränderungen auf, deren Auswirkungen auf das Proteinhinweis schwer abzuschätzen sind. Deshalb wurden für die vorliegenden Untersuchungen keine etablierten Zelllinien gewählt (bis auf wenige Ausnahmen), sondern aus peripherem Blut von gesunden Spendern isolierte Lymphozyten, die nur in Kurzzeitkulturen mit Mitogenen stimuliert wurden. Dadurch sollten sekundäre Veränderungen durch Langzeitkultivierung ausgeschlossen werden und für alle untersuchten Individuen gleiche standardisierte Kulturbedingungen geschaffen werden. Außerdem eröffnete die Untersuchung der zellulären Prote-

ine anhand mitogenstimulierter Lymphozyten die Möglichkeit, eine größere Stichprobe von männlichen und weiblichen Individuen vergleichend analysieren zu können, da Blut das am leichtesten zugängliche menschliche zelluläre Material darstellt.

Als nächstes mußte die Wahl der Analysemethode überdacht werden. Bei der Auftrennung der Proteine mit 1-D SDS-PAGE waren mit großer Wahrscheinlichkeit viele Proteinbanden durch die Überlagerung mehrerer Proteine mit gleichem MW entstanden, so daß eine Differenzierung von qualitativen und quantitativen Unterschieden nicht eindeutig möglich war. Um eine höhere Auflösung, d.h. die Möglichkeit der simultanen Darstellung einer wesentlich größeren Zahl von Proteinen und damit eine wesentlich umfassendere Analyse der Proteinmuster zu erreichen, schien es für die vorliegende Arbeit zweckmäßig zu sein, die 2-DE in unserem Labor einzuführen. Denn sie stellt heute die hochauflösendste elektrophoretische Methode zur Trennung komplexer Proteingemische dar.

Folgende Fragestellungen sollten dann mit Hilfe der 2-DE von zellulären Proteinen mitogenstimulierter Lymphozyten bearbeitet werden:

- 1) Die Frage nach der Existenz von geschlechtsspezifischen Unterschieden bei zellulären Proteinen menschlicher Lymphozyten. Aus der Literatur sind keine 2-D Analysen in Bezug auf eine geschlechtsspezifische Genexpression bei Lymphozytenproteinen bekannt. Bisher wurden nur im 2-D Muster menschlicher Fibroblasten zwei Y-abhängige Proteine beschrieben (Müller et al. 1984).
- 2) Individuelle quantitative und qualitative Unterschiede im 2-D Proteinmuster sollten anhand einer Populations-

stichprobe aus Süddeutschland untersucht werden. Durch Familienuntersuchungen und anhand einiger monozygoter Zwillingspaare sollte gezeigt werden, inwieweit die Variationen genetisch determiniert sind und nach welchem Modus sie vererbt werden. Populationsgenetische Aspekte im Sinne einer vergleichenden Analyse mit den in Japan und USA beschriebenen 2-D Polymorphismen schienen interessant zu sein.

- 3) Veränderungen im 2-D Proteinmuster nach Mitogenstimulierung der Lymphozyten sollten aufgezeigt werden, wobei eine Erweiterung der bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zu erhoffen war. Weiterhin sollte die Möglichkeit der Differenzierung von T- und B-Zell spezifischen Proteinen durch Stimulierung mit verschiedenen Mitogenen (PHA, PWM) geprüft werden.

Insgesamt gesehen sollte eine sehr umfassende Analyse der zellulären Proteine menschlicher Lymphozyten im Hinblick auf geschlechtsspezifische, individuell variante, stimulierungssensitive und T- bzw. B-Zell spezifische Proteine mit Hilfe der 2-DE erbracht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Genetisch nicht-verwandte Blutspender

Als genetisch nicht-verwandte Individuen stellten sich 22 Personen zur Verfügung, und zwar 8 männliche und 14 weibliche Spender. Es handelte sich um Studenten unseres Institutes im Alter von 20 bis 30 Jahren. Zusammen mit den 24 Eltern (siehe 2.1.2.) aus den Familienuntersuchungen bildeten diese 46 genetisch nicht-verwandten Personen eine Stichprobe aus dem süddeutschen Raum für populationsgenetische Fragestellungen.

2.1.2. Familien

Für genetische Analysen konnten 12 Familien mit insgesamt 24 Kindern (14 Söhne und 10 Töchter) aus der Münchner Umgebung untersucht werden. Meistens handelte es sich um Familien mit zwei Kindern (8 Familien). Diese gliederten sich in zwei Familien mit je zwei Söhnen, 4 Familien mit je einem Sohn und einer Tochter und zwei Familien mit je zwei Töchtern. Dazu kamen zwei Familien mit nur einem Kind, in beiden Fällen einem Sohn. Weitere zwei Familien mit drei Kindern stellten sich zur Verfügung, eine Familie mit drei Söhnen und eine Familie mit einem Sohn und einem monozygoten weiblichen Zwillingspaar (siehe 2.1.3.). Das Alter der Eltern lag zwischen 30 und 60 Jahren, das der Kinder zwischen 5 und 30 Jahren.

2.1.3. Monozygote Zwillinge

- Zu den genannten Blutspendern zählte ein monozygoten weibliches Zwillingspaar im Alter von 28 Jahren.

- Zwei weitere monozygote Zwillingspaare konnten anhand lymphoblastoider Zelllinien untersucht werden (siehe 2.1.4.).

2.1.4. Lymphoblastoide Zelllinien

Folgende lymphoblastoide Zelllinien wurden für die Experimente verwendet:

- GOJ 1 und GOK 2: lymphoblastoide EBV-transformierte Zelllinien eines weiblichen monozygoten Zwillingspaares mit Diskordanz für Duchenne Muskeldystrophie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J.H.Edwards, Oxford).
- HWL 2 und HWB 2: lymphoblastoide EBV-transformierte Zelllinien eines weiblichen monozygoten Zwillingspaares mit Diskordanz für Tuberöse Sklerose (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J.H.Edwards, Oxford).
- Raji: eine EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinie aus einem Burkitt-Lymphom (Epstein et al. 1966).
- Sabrina und Robert: zwei lymphoblastoide Zelllinien von Kindern mit kongenitaler Agammaglobulinämie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Wolf, München).

2.2. Zellkultur

2.2.1. Blutentnahme

Für ein Experiment wurden in der Regel 30 ml Blut aus der Armvene in einer mit Heparin (Heparin Novo, Novo Industrie GmbH Pharmaceutika, Mainz, 5000 I.E./ml) benetzten sterilen 50 ml Einmalspritze (Becton Dickinson, Irland) mittels einer Butterfly-Kanüle abgenommen. Bei der Blutabnahme wurde auf sterile Bedingungen geachtet.

2.2.2. Lymphozytenisolierung

Alle weiteren Schritte wurden in einer sterilen Werkbank ausgeführt.

Nur aus frisch abgenommenem, 1:2 mit PBS oder RPMI 1640 verdünntem Blut wurden die Lymphozyten isoliert.

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte basierend auf der Methode von Böyum (1968) über Ficoll-Paque-Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg) ist mit einer Dichte von 1.077 g/ml ein gebrauchsfertiges Trennmedium für menschliche Lymphozyten.

Pro Gradient wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen 15 ml Ficoll-Paque vorsichtig mit 20 ml der 1:2 verdünnten Blutprobe überschichtet. Durch Zentrifugation mit $400 \times g$ für 35 min bei 20°C erreichte man die Trennung der Lymphozyten und Monozyten von den Erythrozyten und Granulozyten. Auf Grund ihrer höheren Dichte sedimentieren die Erythrozyten und Granulozyten, während die Lymphozyten zusammen mit den Monozyten in der Interphase zwischen dem Blutplasma und dem Ficoll in einer gut erkennbaren weißen

Bande erscheinen. Diese wurde nach Absaugen des überstehenden Plasmas mit einer Pipette abgenommen. Die gesammelte Lymphozytensuspension wurde mit dem dreifachen Volumen PBS gewaschen und anschließend bei $300 \times g$ für 15 min zentrifugiert (1. Waschen). Es folgten zwei weitere Waschvorgänge, bei denen durch niedrigtourige Zentrifugation ($110 \times g$, 20 min) die verunreinigenden Thrombozyten weitgehend entfernt werden konnten.

Die so gewonnene gereinigte Lymphozytenfraktion umfaßte die Lymphozyten und Monozyten, es handelte sich also um die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die Bestimmung der Zellzahl und der Viability ergab eine Ausbeute von $2.5 - 3.5 \times 10^7$ PBMC/30 ml Vollblut mit einer Viability von $> 98\%$ (Trypanblau-Exclusionstest).

2.2.3. Lymphozytenkultivierung

Die gereinigten mononukleären Zellen wurden normalerweise in RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 0.85 g/l NaHCO_3 , 10 mM Hepes, Penicillin-Streptomycin (Gibco, 1ml/100 ml) und 2 mM Glutamin bei einer Dichte von $1.0 - 1.5 \times 10^6$ Zellen/ml ($2.5 - 3.5 \times 10^7$ Zellen/25 ml Medium) in T75 Gewebekulturflaschen (Nunc) bei 37°C kultiviert. Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Züchtung ohne CO_2 -Atmosphäre. Ab September 1984 stand ein CO_2 -Inkubator zur Verfügung, wodurch die Kultivierung bei 5% CO_2 -Atmosphäre optimiert werden konnte.

Bei bestimmten Experimenten wurde das Kulturmedium in folgender Weise variiert:

- Für die nachfolgende Stimulierung mit PWM wurde die Serumkonzentration auf 6% FCS herabgesetzt (siehe 2.2.4.).
- In einer Versuchsreihe wurde Iscove's modifiziertes MEM,

komplett (Boehringer, Mannheim) verwendet, bei dem der Zusatz von Albumin, Transferrin und Sojabohnenlipid eine Kultivierung ohne FCS erlaubt (Iscoe und Melchers 1978).

2.2.4. Mitogenstimulierung

Die Stimulierung der Lymphozyten erfolgte mit

- a) Phythämagglutinin (PHA-P, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) und
- b) Pokeweed Mitogen (PWM, Gibco, Grand Island, N.Y., USA).

Die lyophilisiert vorliegenden Mitogene wurden in bidestilliertem Wasser aufgelöst, steril filtriert und portioniert eingefroren. Zur Stimulierung wurden nur unmittelbar vorher aufgetaute Mitogene verwendet und Reste einer einmal aufgetauten Probe verworfen.

Eine Kultivierungsdauer der isolierten Lymphozyten von einigen Stunden (4 - 5 h) vor der Stimulierung diente der Adaptation der Zellen an die Kulturbedingungen und einer Regeneration der Zellmembranen. Dann erst wurde die Stimulierung durch Zugabe von 25 μ l PHA (10 μ g/ml) bzw. 50 μ l PWM (20 μ g/ml) eingeleitet.

Während der Stimulierungsdauer von drei Tagen bei PHA bzw. fünf Tagen bei PWM kultivierte man die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂- Atmosphäre (ab Sept. 1984). Die eingesetzten PHA- bzw. PWM-Konzentrationen und die Stimulierungsdauer wurden durch Vorversuche etabliert. Die Optimierung erfolgte erstens auf der Basis einer mikroskopischen Betrachtung der Kulturen in einem Zeitraum von sechs Tagen bei verschiedenen Mitogenkonzentrationen. Zweitens wurde bei einer Versuchsreihe mit steigenden Mitogenkonzentrationen der metabolische Einbau von ³H-Leucin bestimmt. Die für eine Stimulierung einsetzbaren Mitogenkonzentrationen besaßen eine

gewisse Variationsbreite. So wirkte z.B. PHA bei Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 20 µg/ml ähnlich stimulierend. Bei einer Konzentration von < 2.5 µg/ml konnte kaum noch eine stimulierende Wirkung beobachtet werden. Umgekehrt erreichte man bei sehr hohen Konzentrationen (ab ca. 50 - 100 µg PHA/ml) einen Bereich, in dem PHA schon wieder hemmend auf die Stimulierung wirkte.

Vorversuche mit variierenden FCS-Konzentrationen im Medium hatten ergeben, daß bei PWM-Stimulierungen mit 6 % FCS bessere Ergebnisse erzielt wurden als mit der üblichen 10 % FCS-Konzentration. Daher wurde bei den PWM-Stimulierungen die Serumkonzentration im Medium auf 6 % FCS herabgesetzt. Der Einfluß von FCS auf die PWM-Stimulierung wurde in einem Versuch kontrolliert, in dem serumfreies Medium nach Iscove (siehe 2.2.3.) für eine Stimulierungsreihe eingesetzt wurde.

Eine PHA-Stimulierung erfolgte generell bei den 70 Blutspendern. Bei 16 Personen wurden parallel PHA- und PWM-Stimulierungen durchgeführt. Bei 3 Blutspendern wurden 4 Parallelkulturen angelegt, nämlich Kulturen von unstimulierten Lymphozyten, PHA- und PWM-stimulierten Lymphozyten und zusätzlich von LPS-stimulierten Lymphozyten. Lipopolysaccharid (LPS) gilt im Maus-System als B-Zell-stimulierendes Mitogen. Eine stimulierende Wirkung sollte auch im menschlichen System überprüft werden. Für die Stimulierung wurde LPS aus *Salmonella typhosa* mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Stimulierungsdauer betrug wie bei PWM fünf Tage.

Die Zellen für die jeweils 4 Parallelkulturen (unstimuliert, PHA-, PWM- und LPS-stimuliert) wurden in zwei Fällen nach dem üblichen Stimulierungsprotokoll in FCS-haltigem RPMI 1640 und in einem Fall in dem oben erwähnten, nach Iscove modifizierten kompletten MEM ohne Zusatz von FCS kultiviert.

Für die Ansätze von mehreren Parallelkulturen wurde den Spendern entsprechend mehr Blut abgenommen.

2.2.5. Immunfluoreszenztests

Der Anteil an T- und B-Lymphozyten bei unstimulierten, PHA- und PWM-stimulierten Kulturen wurde über Immunfluoreszenz bestimmt.

a) Der Nachweis der B-Zellen über ihr Oberflächenimmunglobulin erfolgte folgendermaßen:

- 1×10^6 Zellen in kaltem (4°C) PBS mit 0.02 % Natriumazid waschen und bei $200 \times g$ für 5 min bei 4°C abzentrifugieren.
- Inkubation mit 20 μl des 1 : 10 in PBS/0.02 % Natriumazid verdünnten Fluorescein-konjugierten Antikörpers, einem anti-human-Ig / IgG + IgA + IgM, H- und L-Ketten, aus der Ziege (OTKG 04/05, Behringwerke AG, Marburg) für 20 - 25 min bei 4°C .
- Zellen dreimal mit je 1 ml PBS/0.02 % Natriumazid waschen, jeweils bei $200 \times g$ für 5 min bei 4°C abzentrifugieren.
- Resuspendieren der Zellen in 20 μl PBS/0.02 % Natriumazid.
- Einen Tropfen (ca. 10 μl) der Zellsuspension auf einen Objektträger geben und ein Deckglas darauflegen.
- Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz): Zellen mit fluoreszierendem Saum wurden als positiv gezählt. Durchgehend fluoreszierende Zellen stellten tote Zellen dar. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte im Durchlicht. Der Anteil an B-Lymphozyten ergab sich dann aus der Zahl der FITC-positiven Zellen, während sich die Zahl der T-Lymphozyten aus der Diffe-

renz der Gesamtlebendzellzahl und den FITC-positiven Zellen errechnen ließ.

Die Bestimmung der B-Zellen mit diesem direkten Immunfluoreszenztest über das Oberflächenimmunglobulin wurde parallel mit PHA-, PWM- und LPS-stimulierten und unstimulierten Lymphozyten dreimal durchgeführt.

Der Nachweis des Oberflächenimmunglobulins erfolgte zur Kontrolle auch bei den EBV-transformierten Zelllinien. Neben dem FITC-markierten anti-human-Ig / IgG + IgA + IgM, H- und L-Ketten (Behring) wurde auch ein FITC-konjugiertes anti-human Ig / F(ab')₂ aus der Ziege (Medac) getestet.

- b) In einer Versuchsreihe (Kultivierung in Iscove Medium) wurden bei PHA-, PWM-, LPS-stimulierten und unstimulierten Lymphozyten eines Individuums auch umgekehrt die T-Zellen in einem indirekten Immunfluoreszenztest mittels eines monoklonalen T-Zell-spezifischen Antikörpers (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Rieber, München) nachgewiesen:
- 1×10^6 Zellen in PBS/0.02 % Natriumazid waschen und bei $200 \times g$ für 5 min bei $4^\circ C$ abzentrifugieren.
 - Inkubation mit dem monoklonalen anti-T-Zell-spezifischen Ak aus der Maus für 25 min bei $4^\circ C$.
 - Zellen dreimal mit PBS/0.02 % Natriumazid waschen und jeweils bei $200 \times g$ für 5 min bei $4^\circ C$ abzentrifugieren.
 - Inkubation mit dem zweiten Antikörper, einem FITC-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Ig für 25 min bei $4^\circ C$.
 - Dreimal mit PBS/0.02 % Natriumazid waschen, zentrifugieren bei je $200 \times g$ für 5 min bei $4^\circ C$.
 - Resuspendieren der Zellen in $20 \mu l$ PBS/0.02 % Natriumazid.
 - Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop wie beschrieben. Die fluoreszierenden Zellen stellten nun die T-

Zellen dar, während sich die B-Zellzahl aus der Differenz der Gesamtlebendzellzahl und den T-Zellen errechnete.

2.2.6. Kultivierung der lymphoblastoiden Zelllinien

Die lymphoblastoiden Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS oder 12.5% FCS (je nach Zelllinie), Penicillin-Streptomycin (Gibco, 1 ml/100 ml), 4 mM Glutamin und 2.0 g/l NaHCO_3 bei 37°C bei einer Dichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml in T75 Gewebekulturflaschen (Nunc) gezüchtet. Alle zwei bis drei Tage erfolgte eine routinemäßige Subkultivierung der Zellen, indem ca. 2/3 des verbrauchten Mediums abgeschüttet und durch frisches Medium ersetzt wurden. Dichtwachsende Kulturen (ca. $1.5 - 2.0 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden je nach Bedarf geteilt oder bei der Subkultivierung die Hälfte der Zellsuspension verworfen.

Die Serumkonzentration im Medium variierte bei den verschiedenen Zelllinien. Für HWL 2, HWB 2, GOJ 1 und GOK 2 wurden 12.5% FCS eingesetzt, für die anderen Zelllinien (Raji, Robert und Sabrina) 10% FCS.

Die Zelllinien HWL 2, HWB 2, GOJ 1 und GOK 2 wurden nach ihrem Eintreffen aus England ca. 4 Monate für die Dauer der Experimente in Kultur gehalten. Die Zelllinien Sabrina und Robert befanden sich ebenfalls nur für den Zeitraum der Experimente (ca. 3 Monate) in Kultur. Die Zelllinie Raji ist in unserer Gewebekultur als Dauerzelllinie etabliert.

2.3. Metabolische Markierung der Zellen

2.3.1. Metabolische Markierung mit ^3H -Leucin

a) Periphere Blutlymphozyten

Nach drei bzw. fünf Tagen Kultivierung erfolgte die metabolische Markierung der stimulierten Lymphozyten mit ^3H -Leucin (NEN, New England Nuclear, NET-460, $[\text{L-3,4,5-}^3\text{H(N)}]\text{-leucine}$). Dazu wurden die Zellen bei $110 \times g$ für 20 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und pro Kultur in 10 ml leucinfreiem RPMI 1640 (Serva, Heidelberg) mit 10 % FCS (bzw. 6 % FCS bei PWM), Penicillin-Streptomycin (Gibco, 1 ml/100 ml), 2 mM Glutamin, 0.85 g/l NaHCO_3 und 10 mM Hepes resuspendiert. Nach Überführen in T25 Gewebekulturflaschen (Nunc) ließ man die Kulturen 4-5 h lang bei 37°C und 5 % CO_2 "aushungern", um das vorhandene Leucin-Depot der Zellen abzubauen. Anschließend wurden pro Kulturansatz 100 μCi ^3H -Leucin zugegeben und die Zellen 14-16 h lang bei 37°C markiert.

Im allgemeinen erfolgte die ^3H -Leucin Markierung bei allen PHA- und PWM-stimulierten Zellen. Eine Ausnahme bildeten die drei Versuchsreihen mit parallel angelegten PHA-, PWM-, LPS-stimulierten und unstimulierten Kulturen. Hier wurde nur bei der in Iscove's Medium angesetzten Stimulierungsreihe eine ^3H -Leucin Markierung durchgeführt. Unstimulierte Kulturen wurden wegen ihrer sehr geringen Stoffwechselaktivität nicht markiert, da kaum ein ^3H -Leucin Einbau zu erwarten war.

b) Lymphoblastoide Zelllinien

Bei den lymphoblastoiden Zelllinien wurden für eine Markierung ca. $2 - 3 \times 10^7$ Zellen aus Kulturen, die ungefähr zwei

Tage vorher geteilt wurden, eingesetzt. Die Markierung erfolgte prinzipiell wie bei den stimulierten PBL, nur daß das Medium den Bedingungen während der routinemäßigen Kultivierung (siehe 2.2.6.) angepaßt war. Für die Markierung wurde leucinfreies RPMI 1640 mit 10 % bzw. 12.5 % FCS, Penicillin-Streptomycin (Gibco, 1 ml/100 ml), 4 mM Glutamin und 2.0 g/l NaHCO₃ eingesetzt.

Die lymphoblastoiden Zelllinien der beiden monozygoten Zwillingspaare (HWL 2, HWB 2, GOJ 1, GOK 2) wurden zur Demonstration der Reproduzierbarkeit je zweimal im Abstand von ca. 2 Monaten markiert. Bei den Zelllinien Raji, Robert und Sabrina erfolgte die ³H-Leucin Markierung nur jeweils einmal.

2.3.2. Metabolische Markierung mit ³H-Galaktose und ³H-Fucose

Die Zelllinie HWL 2 wurde nicht nur mit ³H-Leucin, sondern parallel auch mit ³H-Galaktose (NEN, New England Nuclear, NET-698, Galactose-D-[4,5-³H(N)]) und ³H-Fucose (NEN, New England Nuclear, NET-516 A, Fucose-L-[5,6-³H]) markiert. Die Zuckermarkierungen sollten der Differenzierung von Proteinen und Glykoproteinen dienen.

Verglichen mit der ³H-Leucin Markierung (siehe 2.3.1.) wurde das Markierungsprotokoll in folgender Weise abgeändert:

Statt einer Kultivierung in leucinfreiem Medium erfolgte die Kohlehydratmarkierung in einem Medium, dessen Glucosegehalt um die Hälfte reduziert war. Dieses Medium wurde durch Mischung von RPMI 1640 mit glucosefreiem RPMI 1640 (Seromed) hergestellt. Die Erniedrigung des Glucosegehaltes sollte die Zellen dazu bringen, die angebotenen ³H-Zucker zu metabolisieren, anstatt ihren Energiebedarf aus der Glucose

des Mediums zu decken.

2.4. Zellpräparationen

2.4.1. Zellysate

Die Präparation von Zellysaten (cytosolische Proteine und Plasmamembranproteine) für die zwei-dimensionale Elektrophorese wurde

- a) mit unstimulierten Zellen nach 3 Tagen Kultivierung,
 - b) mit PHA-, PWM- und LPS-stimulierten Lymphozyten nach 3 bzw. 5 Tagen Kultivierung,
 - c) mit PHA-, PWM- und LPS-stimulierten, ^3H -Leucin markierten Lymphozyten,
 - d) mit den ^3H -Leucin markierten lymphoblastoiden Zelllinien HWL 2, HWB 2, GOJ 1, GOK 2, Raji, Sabrina und Robert und
 - e) mit ^3H -Galaktose und ^3H -Fucose markierten Zellen der Zelllinie HWL 2
- durchgeführt.

Dabei wurden die Zellen nach Abzentrifugieren bei $110 \times g$ für 20 min in PBS gewaschen, wiederum unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und das Zellpellet in ungefähr dem 5 fachen Volumen Lyse-Puffer nach O'Farrell (9.5 M Harnstoff, 2 % NP-40, 2 % Ampholine pH 3.5 - 10, 5 % Mercaptoäthanol) resuspendiert. Durch kräftiges Quirlen auf einem Vortex-Mischer erfolgte die Lyse der Zellen. Das unlösliche Kernmaterial wurde durch Zentrifugation bei $800 \times g$ entfernt und die verbleibenden Überstände als Zellysate bei -80°C portioniert eingefroren.

2.4.2. Cytosolische Proteine

Parallel zu den Zellysatpräparationen erfolgte die Präparation cytosolischer Proteine aus PHA-stimulierten, ^3H -Leucin markierten Lymphozytenkulturen von 11 Blutspendern nach der von Hamaguchi et al. (1981) beschriebenen Methode. Nach dem Waschen der Zellen (siehe 2.4.1.) wurden diese in einem 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7.4, mit 0.5 % NP-40, 150 mM NaCl und 1 mM PMSF durch Schütteln auf dem Vortex lysiert. Nach Zentrifugation bei 105 000 x g (UZ, Ti 75 Rotor, 40 000 upm) für 60 min bei 4°C erhielt man die cytosolischen Proteine im Überstand, der abgenommen und bei -80°C eingefroren wurde.

2.4.3. Triton X-100 Extrakte

Triton X-100 Extrakte wurden von PHA-stimulierten, ^3H -Leucin markierten Lymphozyten von 4 Individuen parallel zu Zellysaten und cytosolischen Proteinen in Anlehnung an Van Eijk und Mühlradt (1981) hergestellt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in einem Extraktionspuffer (1 % Triton X-100, 2 mM PMSF in PBS pH 7.2) vorsichtig resuspendiert und bei 4°C 20 min lang geschaukelt. Unlösliches Material konnte durch Zentrifugation bei 200 x g pelletiert werden. Der resultierende Überstand wurde nochmals bei 10 000 x g für 30 min bei 4°C (UZ, Ti 75 Rotor, 12 000 upm) zentrifugiert. Der zweite klare Überstand enthielt die Triton X-100 extrahierbaren Proteine und wurde bei -80°C eingefroren.

- 10 % Ammoniumperoxodisulfat
- Anodenpuffer: 0.01 M H_3PO_4
- Kathodenpuffer: 0.02 M NaOH

c) Gelzusammensetzung und Gelherstellung

Aus den genannten Stocklösungen wurde eine Gellösung mit den Endkonzentrationen 8.3 M Harnstoff, 3.8 % Acrylamid, 0.2 % Bisacrylamid, 2 % NP-40, 2 % Ampholine (0.8 % pH 3.5 - 10 und 1.2 % pH 4 - 6), 0.07 % TEMED und 0.01 % Ammoniumperoxodisulfat hergestellt. Im Vergleich zur Methode von O'Farrell war die Harnstoffkonzentration von 9.2 M auf 8.3 M reduziert worden, um die Schwierigkeiten, die mit dem leichten Auskristallisieren des 9.2 M Harnstoffs auftraten, zu umgehen. Weiterhin wurde die Ampholinezusammensetzung modifiziert. Denn bei der Testung verschiedener Ampholinemischungen (pH 3.5 - 10 / pH 4 - 6; pH 3.5 - 10 / pH 4 - 6 / pH 5 - 7; pH 3.5 - 10 / pH 5 - 8) ergab sich für die Mischung aus pH 3.5 - 10 und pH 4 - 6 die beste Trennung über den gesamten pH-Bereich. Dieses Ergebnis kann durchaus spezifisch für die verwendeten Ampholine-Chargen zutreffen.

Die IEF-Gele wurden in 13.5 cm langen Glasröhrchen mit 2 mm innerem Durchmesser 12.5 cm hoch gegossen und sofort mit Wasser überschichtet. Nach 2 h Polymerisation wurde die überstehende Lösung abgesaugt und durch 25 μl 8.5 M Lyse-Puffer, der wiederum mit Wasser überschichtet wurde, ersetzt. An Stelle des 9.5 M Lyse-Puffers (O'Farrell) wurde ein 8.5 M Lyse-Puffer einerseits verwendet, um der Harnstoffmolarität im Gel zu entsprechen, und andererseits, um ein Auskristallisieren des Harnstoffs auf der Geloberfläche zu vermeiden.

d) Laufbedingungen

Die IEF wurde in einer Standardelektrophoresekammer für Röhrchengele (Fa. Hölzl, Dorfen), die 10 Röhrchen faßte, durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Präfokussierung für 15 min bei 200 V, 30 min bei 300 V und weitere 30 min bei 400 V. Anschließend wurden pro Gel 25 µl einer Proteinprobe aufgetragen. Die zellulären Proteine fokussierten ca. 16 h bei 400 V, 1 h bei 600 V und ca. 2 h bei 800 V. Damit wurden insgesamt 8 500 - 9 000 V x h und in den meisten Fäulen genau 8 800 V x h erreicht. Bis zur Verwendung für die 2. Dimension lagerten die IEF-Gele bei -80°C.

2.5.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach dem System von Laemmli (1970) in Gradientengelen von 7.5 % - 20 % Acrylamidkonzentration und in einheitlich 10 % igen Polyacrylamidgelen durchgeführt.

a) Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE

- Trenngelpuffer: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
- Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
- 50 % Acrylamid-Stock: 48.7 % Acrylamid
1.3 % Bisacrylamid
- 10 % SDS-Lösung
- Elektrodenpuffer: 0.025 M Tris
0.129 M Glycin
0.1 % SDS
- SDS-Inkubationspuffer: 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8
2.3 % SDS
5 % Mercaptoäthanol
- 1 % ige Agarose in SDS-Inkubationspuffer

b) Gelzusammensetzung und Gelherstellung

Aus den genannten Stocklösungen wurden für die Trenngele Gellösungen mit den Endkonzentrationen 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 10 % Acrylamid (bzw. 7.5 % und 20 % bei Gradientengelen), 0.1 % SDS, 0.05 % TEMED und 0.015 % Ammoniumperoxodisulfat hergestellt. Der Volumenausgleich für die verschiedenen Acrylamidkonzentrationen erfolgte im Falle der Gradientengele bei der 7.5 % igen Gellösung (leichte Lösung) mit Wasser und bei der 20 % igen Gellösung (schwere Lösung) mit 75 % Glycerin. Bei den 10 % igen Gelen wurde das Volumen mit 35 % Glycerin ausgeglichen.

Die Ausmaße der für die Gradientengele und für die 10 % Gele verwendeten Glasplatten differierten leicht.

Für die Gradientengele wurden Glasplatten mit 15 cm x 21 cm (Höhe x Breite) benutzt. Die Geldicke betrug 2 mm. Die mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossenen Trenngele besaßen eine Trennhöhe von 12.5 cm.

Für die 10 % igen Gele wurden Glasplatten mit den Maßen 16 cm x 18 cm (Höhe x Breite) verwendet. Die Geldicke betrug 1.5 mm und die Trenngelhöhe 13.5 cm.

Nach ca. 6 h Polymerisation des Trenngels bei Raumtemperatur konnte das Sammelgel aufpolymerisiert werden. Es wurde aus den Stocklösungen mit einer Endkonzentration von 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 3.9 % Acrylamid, 0.1 % Bisacrylamid, 0.1 % SDS, 0.1 % TEMED und 0.03 % Ammoniumperoxodisulfat hergestellt und ca. 2.5 cm hoch gegossen.

c) Äquilibrieren und Auftragen der IEF-Gele

Direkt vor dem Start der 2. Dimension erfolgte das Äquilibrieren der bei -80°C gelagerten IEF-Gele durch Inkubation in SDS-Inkubationspuffer (ca. 5 ml pro IEF-Gel) für 25 - 30 min. Danach wurden die IEF-Gele möglichst zerrungsfrei und

luftblasenfrei auf das Sammelgel aufgelegt und mit der warmen Agaroselösung fixiert. Der Agaroselösung zugesetztes Bromphenolblau diente als Farbmarker für die Lauffront der SDS-PAGE.

d) Laufbedingungen

Die Gradientengele liefen entweder ca. 16 h (ÜN) bei konst. 60 V oder für 2 h bei konst. 60 V, bis die Lauffront die Trenngelgrenze erreicht hatte, und anschließend für ca. 6 h bei konst. 150 V, bis die Bromphenolblaufront am Gelende angelangt war (Vertikalelektrophorese-Kammer, Fa. Hölzl, Dorfen).

Die für die SDS-PAGE mit 10 % Gelen verwendete Vertikalelektrophorese-Kammer (LKB-Vertikalelektrophorese-System, LKB Instruments) besaß die Vorteile, daß ein Kühlsystem angeschlossen werden konnte und daß pro Kammer 2 Gele parallel gefahren werden konnten. Die Elektrophoresen wurden in diesem Fall bei 11°C (Wasserkühlung) mit konst. 25 mA, max. 220 V und max. 20 W (LKB power supply 2197) durchgeführt, bis nach ca. 13 - 14 h die Bromphenolblaufront ca. 1/2 cm vom Gelende entfernt war.

e) Fixation der Gele

Nach dem Lauf wurden die Gele je nach weiterer Behandlung (siehe 2.6.) mit 12.5 % TCA, mit 30 % Äthanol / 10 % Essigsäure oder mit 50 % Methanol fixiert.

2.5.3. Bestimmung der isoelektrischen Punkte und der Molekulargewichte der Proteine

a) Bestimmung des pH-Gradienten

Der pH-Gradient wurde in IEF-Gelen gemessen, auf die während der Fokussierung an Stelle der Proteinprobe 25 µl des 8.5 M Lyse-Puffers aufgetragen waren. Nach der IEF wurden diese Gele in 5 mm Stücke geschnitten, in je 0.5 ml entlüftetem bidestilliertem Wasser mehrere Stunden lang geschüttelt und anschließend die pH-Werte an einem pH-Meter gemessen. Ein typisches Beispiel für einen ermittelten pH-Gradienten ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Bei Messung in wässriger Lösung lag der Gradient zwischen pH 4 und pH 7.

Da manche Autoren die pI-Werte der Proteine nach Messung des pH-Gradienten in Harnstoff-Lösung angeben, wurde zur Kontrolle je ein pH-Gradient vergleichend in Wasser und in 8.5 M Harnstoff gemessen. In Gegenwart von Harnstoff verlief die Kurve ähnlich, aber um ca. 0.7 - 1.0 pH-Einheiten nach oben verschoben (siehe Abb.1).

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen pI-Werte der Proteine beziehen sich immer auf die Messung des pH-Gradienten in wässriger Lösung.

b) Bestimmung der Molekulargewichte

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine in der SDS-PAGE wurden zwei verschiedene Marker-Protein-Kits verwendet. Der eine Kit (combithek, MW 20 000 - 340 000, Boehringer, Mannheim) enthielt die Markerproteine α_2 -Makroglobulin aus Rinderplasma (MW 340 000 D, nicht-reduziert bzw. 170 000 D, reduziert), Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel (MW 97 000 D), Glutamat-Dehydrogenase aus Rinderleber (MW 55 400 D), Lactatdehydrogenase aus Schweinemuskel (MW

36 500 D) und Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne (MW 20 100 D). Der zweite Kit (MW-SDS-200, Sigma) war aus Myosin aus Kaninchenmuskel (MW 205 000 D), β -Galactosidase aus E.coli (MW 116 000 D), Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel (MW 97 400 D), Albumin aus Rinderserum (MW 68 000 D), Ovalbumin (MW 45 000 D) und Carbonic Anhydrase aus Rindererythrozyten (MW 29 000 D) zusammengesetzt. Beide Kits ergaben für den Molekulargewichtsbereich von 20 000 D - 70 000 D in 10 % Gelen lineare Eichkurven, während im höhermolekularen Bereich die Kurven deutlich anstiegen. Die mit dem Boehringer-Kit ermittelte Eichgerade war im Vergleich zu der Eichgeraden nach dem Sigma-Kit etwas nach oben verschoben, woraus Unterschiede im Molekulargewicht von ca. 5 % resultierten. Da im Sigma Kit weniger glykosilierte Proteine vorhanden waren, und somit die Molekulargewichtsbestimmung als zuverlässiger empfunden wurde, wurde diese Kurve für die Ermittlung der MW der Proteine verwendet. Die in Abb.2 dargestellte Eichgerade beruht auf den aus fünf verschiedenen 10 % igen Gelen gemittelten R_f - Werten der Eichproteine.

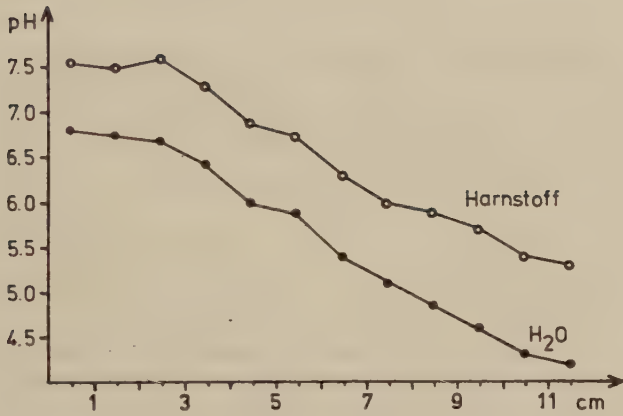


Abb.1. Darstellung des pH-Gradienten nach IEF mit einer Mischung aus Ampholinen pH 3.5-10 und pH 4-6.

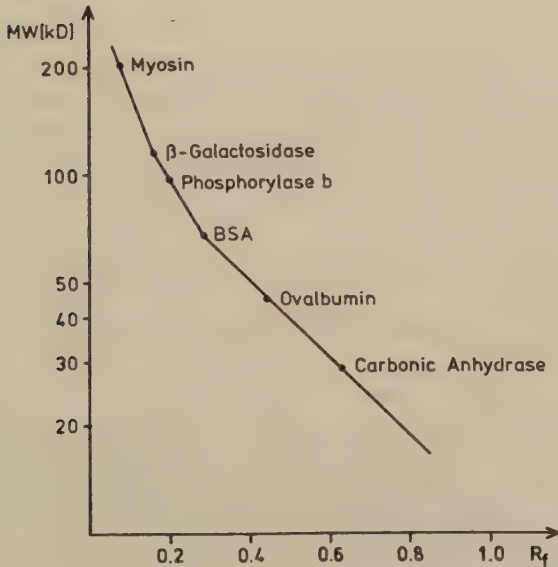


Abb. 2. Darstellung der Eichgeraden zur Molekulargewichtsbestimmung in 10% Gelen.

2.6. Sichtbarmachung der Proteine

Zur Sichtbarmachung der Proteine wurde entweder eine Silberfärbetechnik (siehe 2.6.1.) oder die Fluorographie (siehe 2.6.2.) verwendet, je nachdem, ob die Proteine ^3H -markiert waren oder nicht.

2.6.1. Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Wray et al. (1981) mit kleinen Modifikationen und die Methode nach Heukeshoven und Dernick (1985) angewandt. Die beiden Methoden unterscheiden sich prinzipiell dadurch, daß bei Wray die Bindung der Silberionen in einem basischen Milieu (basisches Silberdiamin) und bei Heukeshoven in einem neutralen Milieu (neutrale Silbernitratlösung) stattfindet.

a) Silberfärbung nach Wray et al.

- Fixation der Gele in 50 % Methanol.
- Waschen in bidestilliertem Wasser für 2 - 3 h mit mehrmaligem Wasserwechsel, um das Glyzerin zu entfernen.
- Nochmalige Inkubation in 50 % Methanol für 2 - 3 h.
- Färbelösung: 1.0 g AgNO_3 /8 ml bidest. H_2O tropfenweise unter Rühren zu einer Mischung aus 2.8 ml 25 % Ammoniaklösung und 42 ml 0.36 % NaOH geben und mit bidest. H_2O auf 200 ml auffüllen.
- Inkubation des Gels in der Färbelösung für 30 min.
- Waschen in deionisiertem Wasser für 10 min mit dreimaligem Wasserwechsel.
- Entwicklung in folgender Lösung: 2.5 ml 1 % Citronensäure / 0.25 ml 38 % Formaldehyd / ad 500 ml mit bidest. H_2O .
- Waschen in bidest. H_2O und Stoppen der Reaktion in 40 % Methanol / 10 % Essigsäure.

b) Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

- Fixation der Gele in 30 % Äthanol / 10 % Essigsäure für mindestens 3 h.
- Waschen in 10 % Äthanol (2 x 10 min).
- Waschen in entionisiertem H_2O (3 x 10 min).
- Inkubation in der Färbelösung (0.1 % $AgNO_3$ in H_2O bidest.) für 30 min.
- Mit Wasser kurz spülen.
- Entwickeln in 2.5 % Na_2CO_3 mit 0.02 % Formaldehyd (ca. 10 min).
- Stoppen mit 1 % Essigsäure (ca. 10 min).
- Waschen mit entionisiertem H_2O (3 x 10 min).
- 10 - 30 sec Inkubation in Abschwächer nach Farmer (0.1 %).
- Waschen in H_2O (3 x 10 min).
- Recycling beginnend bei der $AgNO_3$ -Lösung.

2.6.2. Fluorographie

Verglichen mit der Autoradiographie stellt die von Bonner und Laskey (1974) entwickelte Fluorographie (Szintillationsautoradiographie) eine wesentlich sensitivere Methode dar, die für die Detektion von β -Partikeln mit geringer Energie angewendet wird.

Für die Fluorographie wurden die Gele in 12.5 % TCA oder in 30 % Äthanol / 10 % Essigsäure fixiert. Es folgte die Inkubation in einem Autoradiographie-Enhancer (EN³HANCE, New England Nuclear, Dreieich) für 90 min bei den 1.5 mm dicken Gelen bzw. 2 h bei den 2 mm Gelen. Nach Abschütten des Enhancers wurde das Gel 25 - 30 min (nicht länger) gewässert, was zur Präzipitation des Enhancers im Gel führte. Das Gel wurde dann sofort auf Filterpapier (Whatman 1) unter Hitze und Vakuum in einem Gel Trockner (LKB Instruments) getrocknet (1 - 1 1/2 h). Direkt anschließend erfolgte die Exposition eines Kodak XAR-5 Röntgenfilms für meist 1 - 2 Wochen bei

-80°C. Die Expositionszeit richtete sich nach der Radioaktivität der auf das Gel aufgetragenen Proteinprobe. Oft wurden pro Gel zwei verschiedene Expositionszeiten gewählt, um die Visualisierung der stark und der schwach markierten Proteinspots zu optimieren.

2.7. Auswertung der 2-DE Muster

Die Auswertung der 2-DE Muster erfolgte visuell. Die resultierenden Proteinmuster bei verschiedenen Methoden der Sichtbarmachung der Proteine, bei verschiedenen Stimulierungsmethoden und bei verschiedenen Individuen wurden im Hinblick auf reproduzierbare qualitative und quantitative Unterschiede ausgewertet. Bei qualitativen Unterschieden wurde die Lage eines Proteinspots in Bezug zur Lage der Nachbarproteine und das Vorhandensein oder Fehlen eines Proteinspots berücksichtigt. Als quantitative Unterschiede wurden nur solche beschrieben, welche visuell eindeutig erkennbar waren. Dabei diente die Größe eines Proteins in Relation zur Größe geeigneter Referenzspots als wichtigstes Kriterium der Auswertung, da die absolut aufgetragene Proteinmenge unterschiedlich sein konnte.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Z e l l s t i m u l i e r u n g u n d M a r k i e r u n g

3.1.1. M i k r o s k o p i s c h e B e o b a c h t u n g e n a n d e n Z e l l k u l t u r e n

Mikroskopisch konnten in den Kulturen von PHA- und PWM-stimulierten und unstimulierten Lymphozyten große Unterschiede beobachtet werden.

In den unstimulierten Kulturen fand man wie erwartet fast nur kleine Lymphozyten. Im Laufe der Kulturdauer von drei Tagen konnten mikroskopisch keine Veränderungen an den Zellen festgestellt werden.

Während der Kultivierung mit Mitogenen stieg die Zahl an großen stimulierten Lymphozyten im Laufe der Kulturdauer an. Mit PHA war nach drei Tagen Kultur der Großteil der Zellen stimuliert (ca. 75 % - 90 %). Die stimulierten Zellen bildeten große Zellaggregate, und die dazwischenliegenden Einzelzellen erschienen ebenso in der Mehrzahl als aktivierte Lymphozyten. Mit PWM als Mitogen dauerte es länger, bis stimulierte Zellen beobachtet werden konnten. Auch nach einer Stimulierungsdauer von fünf Tagen lagen wesentlich weniger Zellen (ca. 30 % - 50 %) im aktivierten Zustand vor. Es bildeten sich weniger und kleinere Zellaggregate als bei den PHA-stimulierten Lymphozyten. Individuelle Unterschiede in der Stimulierbarkeit schienen bei PWM größer zu sein als bei PHA.

Ein hemmender Einfluß von FCS auf die PWM-Stimulierung wurde auf Grund von Vorversuchen vermutet und deshalb die FCS-Konzentration auf 6 % herabgesetzt. Bei einem Stimulierungsversuch in serumfreiem Medium (Iscove's MEM, komplett) bestätigte sich diese Vermutung. Die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit PWM war bei mikroskopischer Be-

trachtung im serumfreien Medium größer als in Gegenwart von FCS. Es erschienen wie bei den PHA-Kulturen große Zellaggregate mit stimulierten Zellen. Allerdings dauerte es auch im serumfreien Medium bei PWM länger als bei PHA, bis stimulierte Zellen beobachtet werden konnten.

Die Kulturen, die mit LPS stimuliert wurden, machten eher den Eindruck von unstimulierten Lymphozyten, d.h. mikroskopisch sahen sie wie kleine Lymphozyten aus.

3.1.2. Lymphozytenpopulationen in den unstimulierten und mitogenstimulierten Kulturen (Immunfluoreszenztest)

Der Immunfluoreszenztest über das Oberflächenimmunglobulin ergab bei den unstimulierten Kulturen ca. 13 % B-Zellen, bei PHA-stimulierten Kulturen ca. 8 % B-Zellen und bei PWM- und LPS-stimulierten Kulturen ca. 10 % B-Zellen. Diese Werte wurden bei der Kultivierung der Zellen in dem üblicherweise verwendeten RPMI 1640 mit FCS-Zusatz ermittelt. Die Zahl an B-Zellen in unstimulierten Kulturen entspricht ungefähr dem zu erwartenden Anteil an B-Lymphozyten im peripheren Blut. Eine Abnahme an B-Zellen in PHA-stimulierten Kulturen verglichen mit unstimulierten Kulturen war ebenfalls zu erwarten, da PHA vor allem als T-Zell stimulierendes Mitogen wirkt. Erstaunlich war jedoch das Ergebnis bei der PWM-Stimulierung. Obwohl PWM als polyklonales T- und B-Zell stimulierendes Mitogen beschrieben wird (siehe 1.2.2.), konnte keine signifikante Veränderung in der Verteilung der T- und B-Zellen verglichen mit der PHA-Stimulierung beobachtet werden.

Wie beschrieben wurde ein hemmender Einfluß von FCS auf die PWM-Stimulierung festgestellt. Über Immunfluoreszenztests bei den im serumfreien Medium stimulierten Kulturen sollte eruiert werden, ob sich dieser hemmende Ein-

fluß spezifisch auf die Stimulierung der B-Zellen auswirkt. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den FCS-haltigen Kulturen. Der Anteil an Oberflächenimmunglobulin-tragenden Zellen betrug 13% bei den unstimulierten, 7% bei den PHA-stimulierten, 9% bei den PWM-stimulierten und 15% bei den LPS-stimulierten Zellen.

Für diese Versuchsreihe wurde auch der umgekehrte Nachweis von T-Zellen über indirekte Immunfluoreszenz mit einem T-Zell spezifischen monoklonalen Antikörper durchgeführt. Daraus ergab sich ein T-Zell-Anteil von 87% bei unstimulierten Zellen, fast 100% bei PHA-stimulierten Zellen, 98% bei PWM-stimulierten Zellen und 93% bei LPS-stimulierten Zellen. Der Wert von 87% T-Zellen bei der unstimulierten Kultur korreliert direkt mit dem beobachteten Anteil von 13% Oberflächenimmunglobulin positiven B-Zellen. Bei den stimulierten Kulturen reagierten mit dem T-Zell spezifischen Antikörper sogar mehr Zellen als aus dem Nachweis von Oberflächenimmunglobulin-tragenden Zellen zu erwarten war.

Insgesamt gesehen scheinen bei Kultivierung mit oder ohne FCS sowohl PHA als auch PWM vor allem eine Stimulierung der T-Zellen zu bewirken, während LPS-stimulierte Kulturen eher die T- und B-Zellverteilung von unstimulierten Kulturen reflektieren.

3.1.3. Immunfluoreszenzerggebnisse bei den lymphoblastoiden Zelllinien

Die lymphoblastoiden Zelllinien HWL 2, HWB 2, GOJ 1, GOK 2, Raji, Robert und Sabrina zeigten ca. 80% - 95% Oberflächenimmunglobulin positive Zellen mit dem FITC-konjugierten anti-human-Ig / Ig G, Ig A, Ig M, H- und L-Ketten, wobei die

Immunfluoreszenz insgesamt relativ schwach war. Ähnliche Werte von ca. 80 % - 90 % fluoreszierender Zellen erhielt man mit dem anti-human-Ig / F(ab')₂ - Fragment. Wie für EBV-transformierte Zellen erwartet, lagen also vor allem B-Zellen vor.

3.1.4. Effektivität der metabolischen Markierung

a) Einbau des ³H-Leucins bei mitogenstimulierten Lymphozyten

Der Einbau des ³H-Leucins war in den PHA-stimulierten Kulturen wesentlich effektiver als bei den PWM-stimulierten Zellen. Die Einbauraten wurden aus einem Aliquot der Zellysate im β -Szintillationszähler (Beckman) ermittelt.

PHA-stimulierte Lymphozyten metabolisierten durchschnittlich 1/3 des angebotenen ³H-Leucins (33 %). Individuelle Unterschiede im Einbau der radioaktiven Aminosäure spiegeln wahrscheinlich eine unterschiedliche individuelle Stimulierbarkeit der Lymphozyten wieder. Bei 6 % der Blutspender wurde ein Einbau von 15 μ Ci - 20 μ Ci, bei 22 % von 20 μ Ci - 30 μ Ci, bei 55 % von 30 μ Ci - 40 μ Ci und bei 14 % von 40 μ Ci - 50 μ Ci gemessen.

Bei den PWM-stimulierten Kulturen war nur ein durchschnittlicher Einbau von 10 % des angebotenen ³H-Leucins zu verzeichnen. 25 % der Kulturen metabolisierten weniger als 5 μ Ci, 50 % der Kulturen 5 μ Ci - 15 μ Ci und weitere 25 % der Kulturen 15 μ Ci - 20 μ Ci.

Der wesentlich geringere Einbau bei den PWM-stimulierten Lymphozyten verglichen mit den PHA-stimulierten Zellen korrelierte mit dem beobachteten geringeren Anteil an stimulierten Zellen, der sich in einer geringeren metabolischen Gesamtaktivität der Kulturen niederschlägt.

Eine Ausnahme bildete der Stimulierungsansatz im serum-freien MEM nach Iscove. Hier stand einem metabolischen Einbau von 37 μCi ^3H -Leucin bei PHA-Stimulierung ein Einbau von 33 μCi bei PWM-Stimulierung gegenüber. Die PWM-stimulierten Zellen zeigten also nur eine unwesentlich geringere metabolische Aktivität als die PHA-stimulierten Zellen. Dieses Ergebnis stimmt mit der mikroskopischen Beobachtung eines wesentlich größeren Anteils an stimulierten Lymphozyten bei serumfreier Kultivierung überein.

LPS-stimulierte Lymphozyten wurden nur einmal, und zwar nach Kultivierung in serumfreiem Medium, mit ^3H -Leucin markiert. Der sehr geringe Einbau von nur 0.3 μCi ließ auf eine sehr geringe Stoffwechselaktivität schließen.

b) ^3H -Leucin Einbau bei den lymphoblastoiden Zelllinien

Die Zelllinien HWL 2, HWB 2, GOJ 1 und GOK 2 metabolisierten 45% - 55% des angebotenen ^3H -Leucins. Bei Robert, Sabrina und Raji wurde sogar ein Einbau von 55% - 70% des angebotenen ^3H -Leucins ermittelt. Die hohe Einbaurate bei den lymphoblastoiden Zelllinien spiegelt eine hohe Stoffwechselaktivität wieder, die bei den allgemein zu beobachtenden hohen Teilungsraten EBV-transformierter Zelllinien nicht unerwartet war.

c) Einbau von ^3H -Galaktose und ^3H -Fucose bei der Zelllinie HWL 2

Der Einbau der ^3H -Zucker war wesentlich geringer als der Einbau der Aminosäure. Nur ca. 9% der ^3H -Galaktose und 1.5% der ^3H -Fucose konnten in den Zellsaten wiedergefunden werden.

3.2. 2-DE Muster der zellulären Proteine: Methodische Aspekte der 2-D Analyse

3.2.1. Nomenklatur der Proteine des 2-DE Musters

Für die Proteine des 2-DE Musters wurde eine einheitliche, in der gesamten Arbeit konsequent eingehaltene Nomenklatur gewählt. Diese wird am Beispiel eines 2-D Fluorogramms in Abb.3 gezeigt.

Im allgemeinen bekamen alle Proteine, die im Laufe der Arbeit diskutiert werden, eine Spotnummer zugeteilt. Die fortlaufende Nummerierung beginnt bei dem Protein mit dem größten Molekulargewicht und endet bei dem Protein mit dem niedrigsten Molekulargewicht. Bei Proteinen mit sehr ähnlichen MW erfolgte die Nummerierung vom basischen zum sauren Protein. Proteine, die zu einem späteren Zeitpunkt neu in die Nomenklatur aufgenommen wurden, erhielten unabhängig vom MW die nächste fortlaufende Nummer.

Einige Proteine, denen bei der Darstellung der Ergebnisse eine besondere Bedeutung beigemessen wurde (genetische Analysen), erhielten eine detailliertere Bezeichnung, die sich auf das MW des Proteins bezieht. Der vorangestellte Buchstabe p steht allgemein für Proteine. Falls eine eindeutige Zuordnung zur Gruppe der Glykoproteine stattfinden sollte, kann diese Bezeichnung p durch gp (Glykoprotein) ersetzt werden. Die hinter p stehende Zahl gibt das ungefähre MW in kD an. So wird z.B. ein Protein mit 60 kD als p 60 bezeichnet.

Diese Nomenklatur ist weiter ausbaufähig. Wenn z.B. ein Protein eindeutig zur cytosolischen Fraktion der Zelle zuzuordnen ist, kann dies mit der Bezeichnung cp veranschaulicht werden, usw.

Das im 2-DE Muster als Aktin bekannte Protein erhielt die Bezeichnung A. Proteine, die in einem Zusammenhang nur als Referenzproteine gebraucht werden, wurden in der jeweiligen Abbildung mit R bzw. R_1 , R_2 usw. bezeichnet.

Neben der Nomenklatur der Proteine sind in Abb.3 auch die ungefähren MW und pI-Werte der Proteine an den beiden Koordinaten abzulesen.

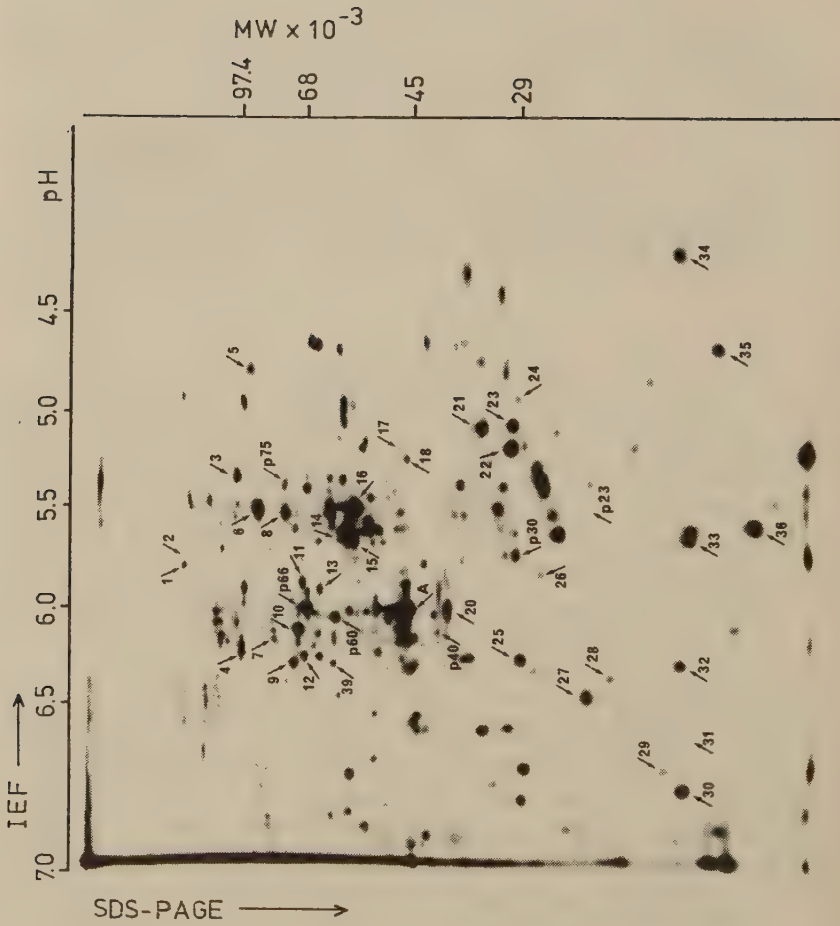


Abb. 3.
Nomenklatur der Proteine
im 2-DE Muster anhand
eines Fluorogramms. Ori-
entierung der IEF (Am-
pholine pH 3.5-10 und
pH 4-6) von links (Ka-
thode) nach rechts
(Anode). Orientierung
der SDS-PAGE (10% Gel)
von oben (hohe MW) nach
unten (niedrige MW). An
den Koordinaten sind die
MW und pI-Werte der Pro-
teine abzulesen.

3.2.2. Das Auflösungsvermögen der 2-D Elektrophorese

Das Auflösungsvermögen der 2-DE ist abhängig von der gewählten Art der Sichtbarmachung der Proteine. In silbergefärbten Gelen konnten 200 - 250 Proteinspots identifiziert werden, wobei relativ wenige Proteine im niedrigmolekularen Bereich (< 40 kD) erscheinen. Zur Illustration sei auf Abb.6 (Kap.3.3.) hingewiesen.

Bei den Fluorogrammen zeigten sich erhebliche Unterschiede bei verschiedenen langen Expositionszeiten der Filme. Wurden gut markierte Zellysate aufgetragen (ca. 1×10^6 cpm), so konnten nach 2 - 3 Tagen Exposition ca. 250 Proteinspots, nach 5 - 7 Tagen ca. 400 und nach 10 - 14 Tagen ca. 450 - 475 Proteinspots differenziert werden. Davon waren nach 2 - 3 Tagen Exposition ca. 100, nach 5 - 7 Tagen Exposition ca. 150 und nach 10 - 14 Tagen Exposition ca. 200 Proteine relativ gut markiert. In Abb.4 sind zwei Fluorogramme vergleichend nach 2 Tagen (A) und nach 10 Tagen (B) Expositionszeit dargestellt.

Bei langer Expositionszeit stieg die Zahl der differenzierbaren spots im Molekulargewichtsbereich unter 40 kD stärker an als in dem insgesamt besser markierten Bereich zwischen 40 kD und 80 kD. Eng nebeneinander liegende stark markierte Proteine konnten nach langer Expositionszeit kaum noch differenziert werden, da sie optisch miteinander verschmelzen.

Bei der Auftrennung von schlecht markiertem Material reichte die Strahlung nicht aus, um schwach markierte spots sichtbar zu machen. Die Zahl der beobachteten Proteinspots stieg auch bei Verlängerung der Expositionszeiten kaum mehr an. Dieser Effekt ist dadurch erklärbar, daß die Radioaktivität und die Filmschwärzung nicht in einem linearen, sondern in einem exponentiellen Zusammenhang stehen.

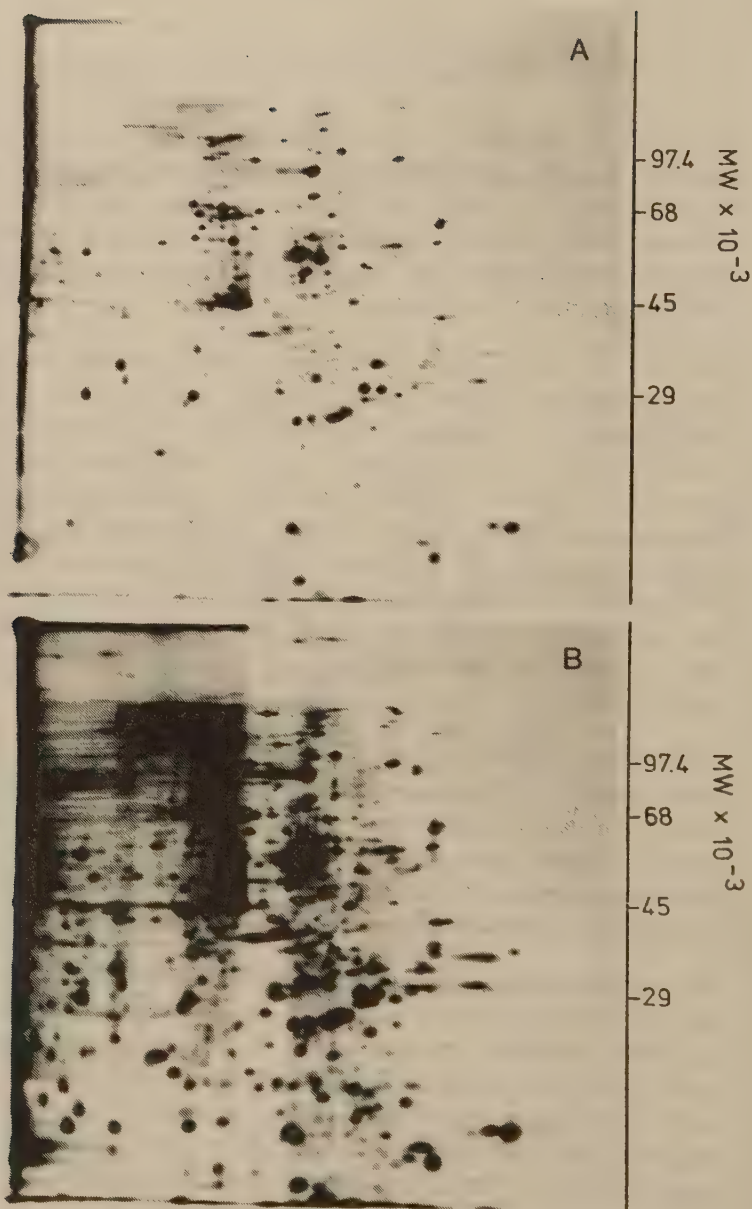


Abb.4. 2-D Fluorogramme von zellulären Proteinen PHA-stimulierter, ^3H -Leucin markierter Lymphozyten nach A) 2 Tagen und B) 10 Tagen Exposition (SDS-PAGE 10%).

3.2.3. Reproduzierbarkeit des 2-D Proteinmusters bei multiplen Analysen eines Zellpräparates

a) Reproduzierbarkeit der 2-D Auftrennung

Die Auftrennung der Proteine in der 2-DE war im allgemeinen gut reproduzierbar. Die Abb.5 veranschaulicht die Reproduzierbarkeit der 2-D Trennung anhand von 3 Fluorogrammen unabhängig voneinander durchgeführter 2-DE des selben Zelllysates.

Bei der 2.Dimension, der SDS-PAGE, traten normalerweise keine Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Trennung auf. Geringfügige Unterschiede im Abstand der Proteine in der MW-Dimension waren zu beobachten, wenn die Elektrophoresen nicht gleich weit gelaufen sind. Diese Differenzen beeinträchtigen jedoch nicht die eindeutige Zuordnung der sich entsprechenden Proteinspots.

Der Einfluß der IEF auf die Reproduzierbarkeit der Proteinmuster war wesentlich größer. Bei der IEF schien es wichtig zu sein, exakt gleiche Bedingungen, d.h. gleicher Ampholine-Batch, gleiche Gelhöhe, gleiche Polymerisationszeit und gleiche Fokussierzeit einzuhalten. Auch ein Einfluß der Jahreszeit (Klima) auf die Trennung war nicht auszuschließen.

Entlang des pH-Gradienten beobachtete man eine unterschiedlich gute Reproduzierbarkeit. Der anodale Bereich (pH 4.0-6.0) war bei gleichen IEF-Bedingungen sehr gut reproduzierbar. Entweder durch geringfügige Unterschiede in der Steilheit des pH-Gradienten oder durch Dehnung des IEF-Gels beim Auftragen auf die 2.Dimension variierten die Proteinmuster in ihrer absoluten Ausdehnung minimal. Die Proteine waren jedoch immer in reproduzierbarer Lage in Bezug auf die Nachbarproteine zu finden. Engere pH-Bereiche konnten oft sogar deckungsgleich aufeinander projiziert werden.

Am kathodalen Ende war die Variabilität etwas größer. Der

pH-Gradient schien hier nicht so gut reproduzierbar zu sein. Unterschiedliche Entfernungen der Proteinspots voneinander waren hier häufiger zu beobachten und auffälliger als anodal. Dies ist z.B. an den Proteinen 30 und 31 in Abb.5 zu erkennen. Die Lage in Bezug auf die Nachbarproteine blieb jedoch erhalten. Allerdings konnte eine unterschiedliche Steilheit des pH-Gradienten auch eine Verschiebung des pH-Wertes an der Auftragstelle bewirken, so daß nicht alle Proteine in das Gel eindringen. So liegen z.B. die in Abb.5 B als Referenzproteine (R) gekennzeichneten spots an oder direkt hinter der Auftragstelle der IEF, während diese bei der in Abb.5 A gezeigten Auftrennung in das IEF-Gel eingewandert sind. Bei einer vergleichenden Analyse konnten zwar in einem solchen Fall die direkt an der Kathode liegenden Proteine nicht ausgewertet werden, aber insgesamt ist die Reproduzierbarkeit der 2-DE der in Abb.5 A und 5 B gezeigten Trennungen als sehr gut zu bezeichnen.

Wesentlich negativer auf die eindeutige Identifizierung der Proteinspots und damit auf die Reproduzierbarkeit wirkte sich ein weiterer Effekt, nämlich das sog. "Streaking" der Proteinbanden im kathodalen Bereich, aus. Die Proteine erschienen dann nicht als scharfe spots, sondern als langgezogene Streifen. Dieser Effekt ist in Abb.5 C zu beobachten. Ein "Streaking" der Proteine trat oft dann auf, wenn relativ viel Proteinmaterial an der Auftragstelle hängen geblieben war. Bei Auftreten dieses Effektes konnten weniger Proteine im kathodalen Bereich identifiziert werden als bei einer optimalen Trennung. Wie in Abb.5 C an den Proteinen 30, 31 und 32 veranschaulicht, folgt dem Bereich der gestreckten Proteinbanden ein Bereich mit auffallend zusammengedrängtem Proteinmuster. Rechts (anodal) von Protein 32 waren die Muster wieder gut reproduzierbar.

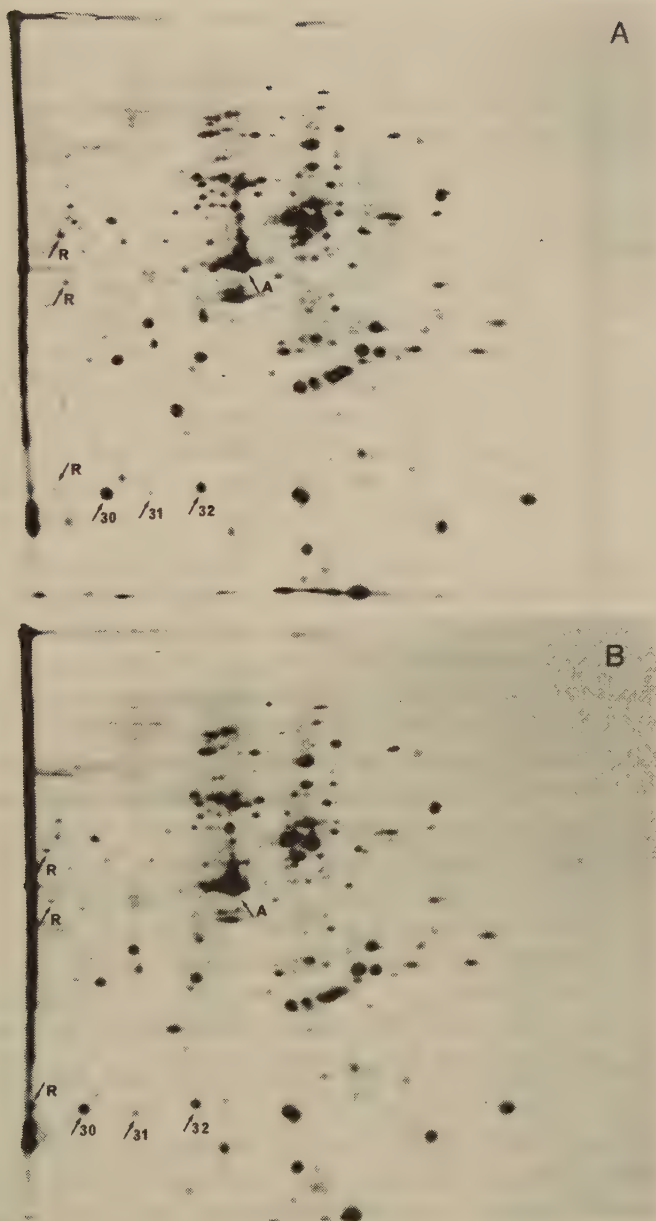


Abb.5. A) und B) Legende siehe nächste Seite

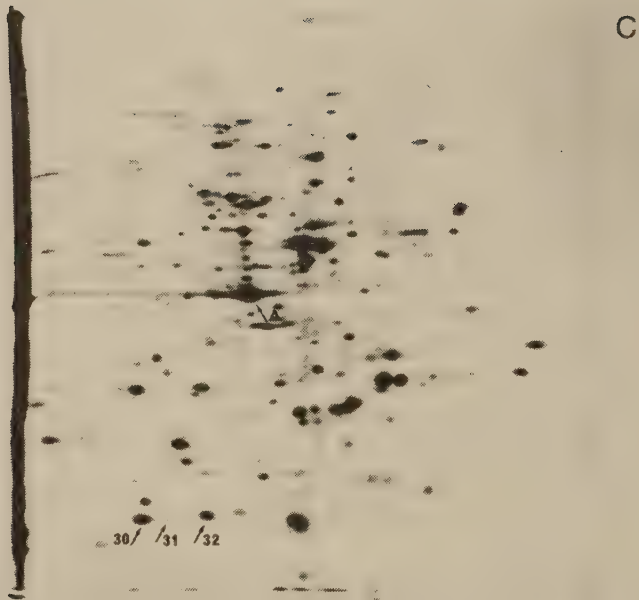


Abb.5. Reproduzierbarkeit der 2-D Auftrennung.

A) und B) zeigen Fluorogramme mit guter Reproduzierbarkeit, während C) das "Streaking" der Proteine im kathodalen Bereich veranschaulicht. Bei A), B) und C) wurde das Zelllysate PHA-stimulierter, ^3H -Leucin markierter Lymphozyten des selben Individuums aufgetragen. Die drei 2-D Trennungen liefen sowohl in der IEF als auch in der SDS-PAGE unabhängig voneinander. Die IEF wurde mit Ampholinen pH 3.5-10 und 4-6, die SDS-PAGE in 10% Gelen durchgeführt.

b) Reproduzierbarkeit der Fluorographie

Durch Chargenunterschiede des verwendeten Enhancers kam es zu differierenden Verstärkungseffekten bei der Fluorographie. Dies konnte jedoch im allgemeinen durch Variation der Expositionszeiten ausgeglichen werden.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde von der Firma NEN die Zusammensetzung des EN³HANCE verändert. Geringere Schrumpfungseffekte während der Enhancerbehandlung und eine bessere verstärkende Wirkung des Enhancers wurden daraufhin beobachtet. Ungefähr zum gleichen Zeitpunkt wurde vom Entwickeln der Filme per Hand auf Entwicklung in einem automatischen Entwicklungsapparat umgestellt, was ebenso einen Einfluß auf die Sichtbarmachung der spots und auf die Reproduzierbarkeit der Fluorogramme haben konnte.

Für die Reproduzierbarkeit der Fluorographie wirkte sich die Verwendung von 10% Gelen an Stelle der Gradientengele positiv aus. Dies kann an einer gleichmäßigeren Inkubation und anschließenden Präzipitation des Enhancers bei durchgehend gleicher Porengröße des Gels liegen. Weiterhin ließen sich die 10% Gele wesentlich besser trocknen als die 7.5%-20% Gradientengele, was natürlich auch einen Einfluß auf die Filmbelichtung haben konnte.

Insgesamt gesehen erwies sich die Methode der Fluorographie vor allem bei der Verwendung von SDS-Gelen mit einheitlicher Acrylamidkonzentration als sehr gut reproduzierbare Methode.

c) Reproduzierbarkeit der Silberfärbungen

Bei den Silberfärbungen konnten nur dann reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden, wenn exakt die gleichen Bedingungen eingehalten wurden. Auf geringfügige Veränderungen reagierte die Silberfärbung sehr empfindlich. Geringste Verunreinigungen der verwendeten Gelwannen oder Chemikali-

en mit Proteinen und Chargenänderungen der Chemikalien konnten das Ergebnis völlig verändern, selbst wenn das Färbeprotokoll an sich genau eingehalten wurde. Starke Schwankungen in der Hintergrundfärbung des Gels und in der Anfärbbarkeit der Proteine selbst waren das Resultat. Weiterhin erwies es sich als schwer durchführbar, die Entwicklung bei allen Gelen beim gleichen Färbegrad zu stoppen.

Über längere Zeiträume schien es kaum möglich, mit Silberfärbungen reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Bei einer 2-D Analyse, bei der sehr viele Gele miteinander zu vergleichen sind, ist jedoch die Reproduzierbarkeit der Färbemethode eine wichtige Voraussetzung. Vor allem für die langfristigen Untersuchungen wie die Analyse genetischer Polymorphismen (Kap.3.6. und 3.8.) und populationsgenetische Untersuchungen (Kap.3.9.) wurde deshalb die Fluorographie gegenüber der Silberfärbung als Visualisierungsmethode bevorzugt.

3.3. Vergleich der 2-DE Muster bei Silberfärbung und Fluorographie

Nachdem das unterschiedliche Auflösungsvermögen (3.3.2.) und die unterschiedliche Reproduzierbarkeit (3.2.3.) der 2-DE bei Silberfärbung und Fluorographie beschrieben wurden, soll das 2-DE Muster bei den verschiedenen Methoden der Sichtbarmachung der Proteine detailliert im Vergleich dargestellt werden.

Anfangs wurde für die vergleichende Untersuchung von Silberfärbungen und Fluorogrammen nur die Silberfärbemethode von Wray et al. (1981) verwendet. Da die gewonnenen Resultate eventuell spezifisch für diese Methode zutreffen konnten, wurde in letzter Zeit noch eine weitere Methode, nämlich die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1985) zum Vergleich herangezogen.

In Abb.6 sind die 2-DE Muster mit Silberfärbung nach Wray (A), mit Silberfärbung nach Heukeshoven (B) und mit Fluorographie (C) vergleichend dargestellt. Bei allen drei 2-DE wurde das Zellysat PHA-stimulierter Lymphozyten des selben Individuums aufgetrennt.

Die drei Proteinmuster zeigen auffallende qualitative und quantitative Unterschiede. Man erkennt Proteine, die

- a) spezifisch bei Silberfärbungen erscheinen und die
- b) spezifisch oder zumindest quantitativ erhöht bei Fluorogrammen auftreten.

a) Für Silberfärbungen charakteristische Proteine

Bei Silberfärbungen konnten 3 Proteine beobachtet werden, die im allgemeinen auf Fluorogrammen fehlen (Abb.6., spot 2, 37 und 38).

Ein Protein mit MW 150 000 D (spot 2) trat bei den silber-

gefärbten Gelen immer in Assoziation mit einem Protein mit gleichem MW, aber leicht basischerem pI auf (spot 1). Dieser spot 1 erschien auf Fluorogrammen deutlich markiert, während das bei den Silberfärbungen danebenliegende Protein 2 auf Fluorogrammen meist nicht zu erkennen war. Nur bei sehr gut markierten Zellysaten konnte dieses Protein auch auf Fluorogrammen beobachtet werden, es war dann allerdings immer wesentlich schwächer markiert als das Protein 1. Das bedeutet, daß der für Silberfärbungen charakteristische Proteinspot 2 eher als quantitativer und nicht als qualitativer Unterschied zwischen den beiden Methoden zu beurteilen ist.

Die beiden anderen bei Silberfärbung spezifisch auftretenden Proteine stellten echte qualitative Unterschiede dar. Es handelt sich um die Proteine 37 mit MW 69 000 D und 38 mit MW 64 000 - 68 000 D. Das Protein 37 verhielt sich in der IEF heterogen und erschien demnach in mehreren nebeneinanderliegenden spots unterschiedlicher Stärke. Das Protein 38 wies ebenso eine Ladungsheterogenität auf, die zusätzlich mit leichten Molekulargewichtsunterschieden der einzelnen Komponenten verbunden war. Daraus resultierte eine charakteristische Spotreihe aus Proteinen mit in anodaler Richtung steigenden Molekulargewichten.

Proteine, die spezifisch bei Silberfärbung des Gels auftreten, können entweder mit ^3H -Leucin nicht markierte zelluläre Proteine darstellen, oder es können Komponenten sein, die aus dem Kulturmedium in die Zelle aufgenommen oder an die Zellmembran adsorbiert wurden. Zur Überprüfung dieser beiden Möglichkeiten dienten 2-D Auftrennungen von FCS, von Kulturmedium und von Mischungen aus FCS bzw. Kulturmedium mit Zellysaten. Bei diesen FCS-haltigen Proben wurden nach Silberfärbung die Proteine 37 und 38 ebenso und sogar als quantitativ dominierende spots beobachtet. Zwei Beispiele sind in Abb.7 gezeigt. Damit liegt der Schluß nahe, daß es sich um Komponenten aus dem Kulturme-

dium (FCS) handelt. Solche Proteine treten in 2-D Fluorogrammen grundsätzlich nicht auf, da sie nicht von der Zelle produziert und damit auch nicht mit ^3H -Leucin metabolisch markiert werden. Ein Vergleich mit 2-DE Mustern von Plasma (Anderson und Anderson 1977) und Leber- und Nierenextrakten (Hamaguchi et al. 1982 a) zeigte, daß es sich bei spot 37 um Albumin, eine der Hauptkomponenten des Serums, handeln könnte.

b) Für Fluorogramme charakteristische Proteine

Andere Proteine erschienen auf Fluorogrammen wesentlich intensiver als auf silbergefärbten Gelen. Auffallende quantitative Unterschiede traten bei 10 Proteinen auf, und zwar bei den Proteinen 4, 5, 13, 21, 22, 23, 30, 32, 34 und 35 (siehe Abb.6).

Das Protein 4 mit MW 96 000 D, das in zwei eng nebeneinanderliegenden spots mit leicht unterschiedlichem pI auftrat, war bei der Silberfärbung nach Wray nur sehr schwach und kontrastarm gefärbt. Mit der Methode nach Heukeshoven ließen sich diese Proteine zwar gut anfärben, waren aber quantitativ wesentlich schwächer ausgeprägt als bei den Fluorogrammen.

Das Protein 5 mit MW 91 000 D konnte bei der Silberfärbung nach Wray kaum identifiziert werden. Die Silberfärbemethode nach Heukeshoven ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung dieses Proteins verglichen mit Fluorogrammen.

Wie von mehreren Autoren beschrieben (Merril et al. 1982; Guevara et al. 1982) tauchen bei den Silberfärbungen zwischen 50 000 D und 68 000 D im SDS-Gel horizontale Linien quer über das Gel auf, die durch reduzierende Komponenten wie Mercaptoäthanol verursacht werden. Dies behindert die Visualisierung oder Anfärbbarkeit der Proteine in diesem

Bereich. So schien z.B. das Protein 13 mit MW 62 000 D, das genau auf einer Mercaptoäthanol-schiene lag, entweder nicht angefärbt oder von der Mercaptoäthanolbande überdeckt zu sein.

Im niedrigmolekularen Bereich ($< 40\,000\text{ D}$) waren allgemein deutliche Unterschiede in der Anfärbbarkeit der Proteine zwischen Silberfärbungen und Fluorogrammen zu erkennen. Selbst wenn nur kurze Expositionszeiten gewählt wurden, wie in Abb.6, konnten auf den Fluorogrammen mehr Proteinspots identifiziert werden als auf den meisten silbergefärbten Gelen. Das Fehlen von solchen Proteinspots in silbergefärbten Gelen, die auch in Fluorogrammen nur als schwach markierte spots erscheinen, kann auf der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Methoden beruhen. Deshalb sollen nur einige auffallende quantitative Unterschiede solcher Proteine herausgegriffen werden, die auf Fluorogrammen relativ stark markiert sind.

Als stark markierte Proteine fielen in den Fluorogrammen der spot 21 mit MW 34 000 D, der spot 22 mit MW 30 000 D und der spot 23 mit ebenfalls 30 000 D MW auf, die alle drei einen pI um die 5.0 aufwiesen. Bei der Silberfärbung nach Heukeshoven waren die Proteine 21 und 22 gut angefärbt, lagen aber quantitativ deutlich unter der Spotstärke auf Fluorogrammen, während das Protein 23 nur sehr schwach gefärbt war. Im Vergleich zu dem auf Fluorogrammen und silbergefärbten Gelen ungefähr gleich starken Proteinspot 24 wird dieser quantitative Unterschied sehr deutlich. Bei der Silberfärbung nach Wray ließ sich nur das Protein 21 gut identifizieren, während die Proteine 22 und 23 nur als diffuse Schatten erschienen.

Im Molekulargewichtsbereich von 15 000 D - 20 000 D traten auf Fluorogrammen vier weitere gut markierte Proteine auf, die bei den Silberfärbungen kaum zu erkennen waren. Es handelt sich um das Protein 30 mit MW 17 000 D, das Protein 32 mit 18 000 D, das Protein 34 mit MW 17 000 D und das Pro-

tein 35 mit MW 14 000 D. Das Protein 33, das bei beiden Silberfärbemethoden in der Spotstärke fast mit den Fluorogrammen vergleichbar war, und das Protein 29, das bei der Heukeshoven-Methode ähnlich gut angefärbt war wie bei den Fluorogrammen, können als Referenzspots zur Verdeutlichung der quantitativen Unterschiede in den Proteinen 30, 32, 34 und 35 dienen.

Die genannten Beispiele machen deutlich, daß von einer quantitativ schwächeren Ausprägung der Proteinspots auf silbergefärbten Gelen nicht alle niedrigmolekularen Proteine gleich stark betroffen waren, sondern daß sich auffallende quantitative Unterschiede auf spezifische Proteine beschränkten.

In Tab.1 sind die Proteine, die beim Vergleich von silbergefärbten Gelen mit Fluorogrammen auffallende quantitative oder qualitative Unterschiede erkennen ließen, unter Angabe der ungefähren MW und pI der Proteine zusammengestellt.

Tab.1. Qualitative und quantitative Unterschiede im 2-D Proteinmuster von silbergefärbten Gelen und Fluorogrammen.

spot	MW [kD]	pI	Silberfärbung		Fluorographie
			Wray	Heukeshoven	
2	150	5.75	+	+	(+) oder -
4	96	6.2/6.25	(+)	+	++
5	91	4.6	(+)	+	+
37	69	6.5-6.8	++	++	-
38	64-68	4.3-4.6	++	++	-
13	62	5.9	-	-	+
21	34	5.05	+	+	+++
22	30	5.15	(+)	+	+++
23	30	5.05	(+)	(+)	+++
30	17	6.8	(+)	(+)	++
32	18	6.25	(+)	(+)	+
34	17	4.2	-	(+)	++
35	14	4.6	-	(+)	++

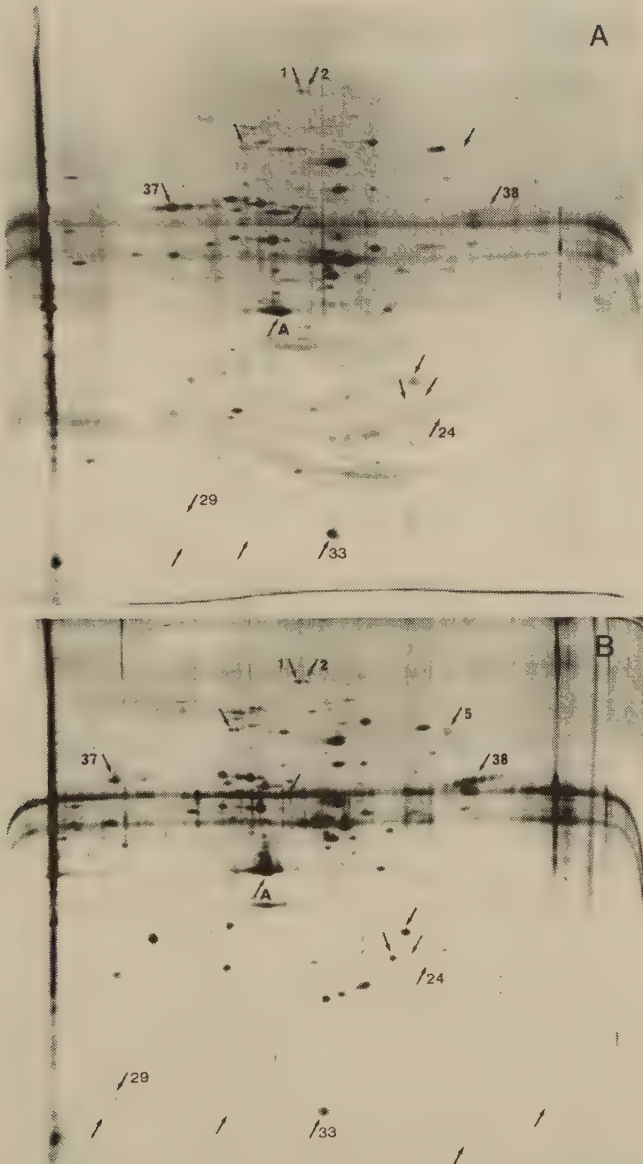


Abb.6. A) und B) Legende siehe nächste Seite

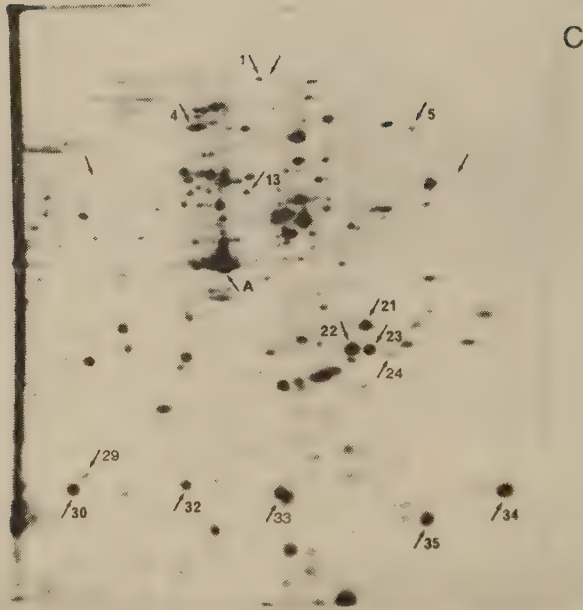


Abb.6. Vergleich der 2-D Muster PHA-stimulierter Lymphozyten des selben Individuums nach A) Silberfärbung nach Wray, B) Silberfärbung nach Heukeshoven und C) Fluorographie.

Qualitative und quantitative Unterschiede im Proteinmuster sind mit Pfeilen gekennzeichnet. MW und pI der Proteine sind aus Tab.1 zu entnehmen.

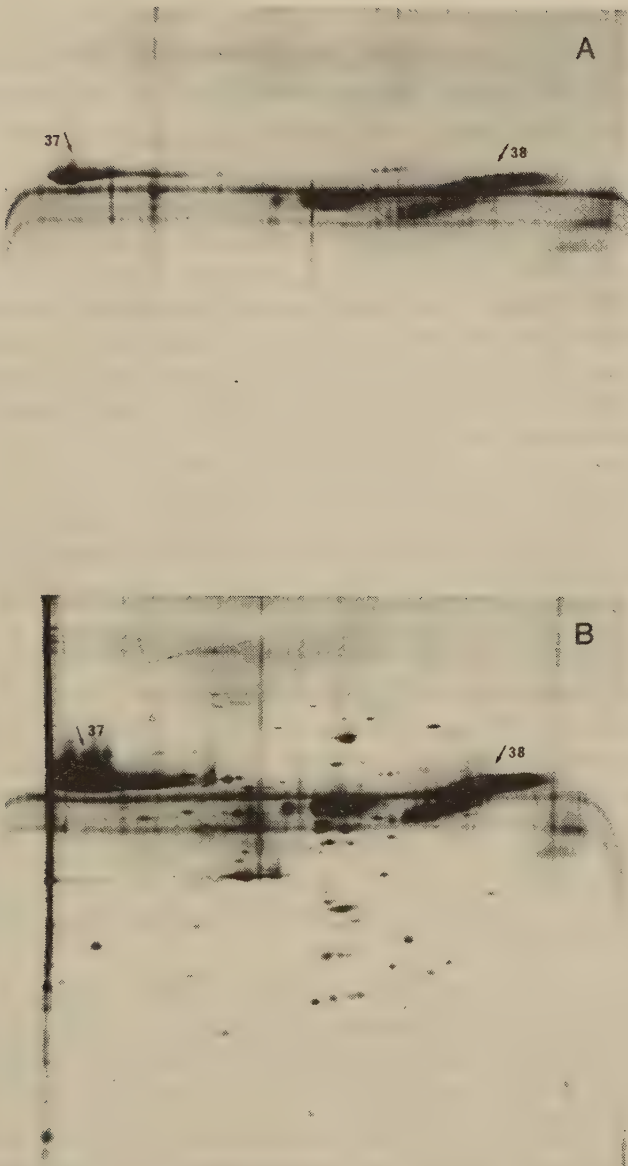


Abb.7. 2-DE von A) RPMI 1640 mit 10% FCS (Kulturmedium ; Verdünnung 1 : 10) und B) einer Mischung aus Zellysatz (15 μ l) und FCS (10 μ l einer 1 : 20 Verdünnung). Die spezifisch bei Silberfärbung beobachteten Proteine 37 und 38 sind gekennzeichnet. MW und pI dieser Proteine siehe Tab.1.

3.4. Veränderungen im 2-D Proteinmuster nach Mitogenstimulierung der Lymphozyten

3.4.1. Vergleich der 2-D Muster von unstimulierten und mitogenstimulierten Lymphozyten nach Silberfärbung

Vergleicht man die 2-D Muster von zellulären Proteinen unstimulierter und PHA-stimulierter Lymphozyten in silbergefärbten Gelen, so erkennt man das quantitative Ansteigen einiger Proteine nach Stimulierung mit PHA. Qualitative Unterschiede im Proteinmuster konnten nicht beobachtet werden.

In Abb.8 sind die 2-D Muster von unstimulierten und PHA-stimulierten Lymphozyten des selben Individuums mit der Silberfärbemethode von Wray vergleichend dargestellt.

Das quantitative Ansteigen von 7 Proteinen nach der Stimulierung konnte mit dieser Methode gezeigt werden. Es handelt sich um Protein 1 mit MW 150 000 D, Protein 6 mit MW 88 000 D, Protein 10 mit MW 69 000 D, Protein p 60 mit MW 60 000 D, Protein 18 mit MW 45 000 D und die Proteine 15 und 16 mit MW 55 000 D.

Die ersten 5 Proteine (spots 1, 6, 10, p 60, 18) stiegen reproduzierbar bei allen vergleichend mit unstimulierten und PHA-stimulierten Lymphozyten untersuchten Individuen nach der Stimulierung an.

Das Protein 1 (MW 150 000 D) stellt einen relativ kleinen Proteinspot dar, es kommt also in geringer Menge in der Zelle vor. Das Ansteigen dieses Proteins nach Stimulierung in Relation zu dem in Abb.8 eingezeichneten Referenzspot 2 ist deutlich zu erkennen.

Das Protein 6 (MW 88 000 D) erscheint in den 2-D Gelen als charakteristischer "Doppelschweif". Wegen mangelnder Reproduzierbarkeit der Silberfärbung wurde nicht bei jedem 2-D

Gel das quantitative Ansteigen aller 7 Proteine gleich gut erkennbar. Die Erhöhung des spot 6 kommt bei dem in Abb.8 gezeigten Beispiel nicht besonders gut zum Ausdruck.

Die Proteine 10 (MW 69 000 D) und p 60 (MW 60 000 D) bilden prominente spots im 2-D Muster PHA-stimulierter Lymphozyten. Ihr Ansteigen nach Stimulierung ist eindeutig zu erkennen. Als Referenzspot kann das Protein p 66 dienen, dessen quantitative Ausprägung in beiden 2-D Mustern ähnlich erscheint.

Ebenso ist in Abb.8 eine quantitative Erhöhung in Protein 18 (MW 45 000 D) eindeutig zu beobachten.

Bei den beiden letzten Proteinen mit MW 55 000 D (spot 15 und spot 16) erkannte man den quantitativen Unterschied nicht immer, da die Position der Proteine zueinander und zu dem darüberliegenden spot 14 mit MW 56 000 D nicht immer identisch war.

Unter Anwendung der Silberfärbemethode nach Heukeshoven (Abb.9) konnte das quantitative Ansteigen dieser 7 Proteine ebenso beobachtet werden. Wegen der besseren Anfärbbarkeit erschien die Erhöhung des Protein 6 nach Stimulierung offensichtlicher. Die Proteine 15 und 16 lagen genau auf einer Mercaptoäthanol-schiene, was eine eindeutige Differenzierung dieser Proteine erschwert. Eine kräftigere Ausprägung dieser Proteingruppe eventuell einschließlich des Protein 14 war nach Stimulierung dennoch meist erkennbar.

In Abb.9 sind die Proteinmuster von unstimulierten und PHA-stimulierten Lymphozyten des selben Individuums nach Silberfärbung mit der Heukeshoven-Methode vergleichend dargestellt. Hier fiel neben dem Ansteigen der beschriebenen 7 Proteine auch häufig eine quantitative Erhöhung in 5 weiteren Proteinen nach Stimulierung auf, und zwar in Protein 3 mit MW 100 000 D, Protein 8 mit MW 76 000 D, Protein 9 mit MW 70 000 D, Protein 39 mit 60 000 D und Protein 33 mit MW

17 000 D / 16 000 D. Bei letzterem waren häufig zwei kaum voneinander getrennte spots zu identifizieren.

Für PHA- und PWM-stimulierte Lymphozyten ergaben sich mit den Silberfärbungen mehr oder weniger identische Muster. PWM verursachte prinzipiell das Ansteigen der selben Proteine wie PHA, nur in etwas geringerem Ausmaß. Ein fließender Übergang in der quantitativen Ausprägung dieser Proteine zwischen unstimulierten, PWM-stimulierten und PHA-stimulierten Lymphozyten schien zu bestehen, wobei je nach individueller Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit PWM die PWM-Muster mehr denen unstimulierter oder denen PHA-stimulierter Lymphozyten glichen.

Die 2-D Proteinmuster LPS-stimulierter Lymphozyten waren nach Silberfärbung von denen unstimulierter Lymphozyten nicht zu unterscheiden.

In Tab.2 sind die Proteine, die nach Stimulierung mit PHA oder PWM quantitativ erhöht waren, unter Angabe ihres ungefähren MW und pI zusammengestellt.

Tab.2. Proteinspots auf silbergefärbten Gelen mit steigender Intensität nach Stimulierung der Lymphozyten mit PHA oder PWM.

spot	MW [kD.]	pI	Methode *
1	150	5.8	W / H
3	100	5.75	(H)
6	88	5.45-5.55	W / H
8	76	5.5	(H)
9	70	6.3	H
10	69	6.15	W / H
39	60	6.3	H
p60	60	6.05	W / H
15	55	5.55-5.65	W / H
16	55	5.45-5.50	W / H
18	45	5.2	W / H
33	17/16	5.6	(H)

* W: Silberfärbung nach Wray et al. (1981).

H: Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1985).

(): nur teilweise zu beobachten.

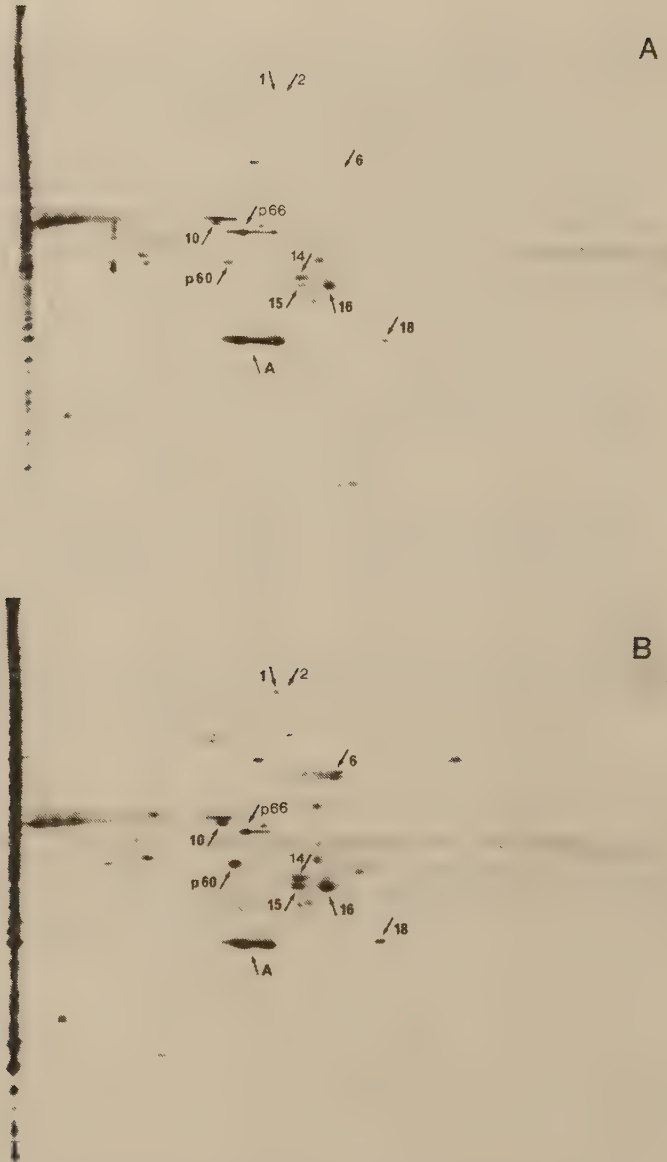


Abb. 8. 2-D Proteinmuster von A) unstimulierten und B) PHA-stimulierten Lymphozyten des selben Spenders. Silberfärbung nach Wray. Quantitative Unterschiede sind mit Pfeilen gekennzeichnet. MW und pI der Proteine siehe Tab.2.

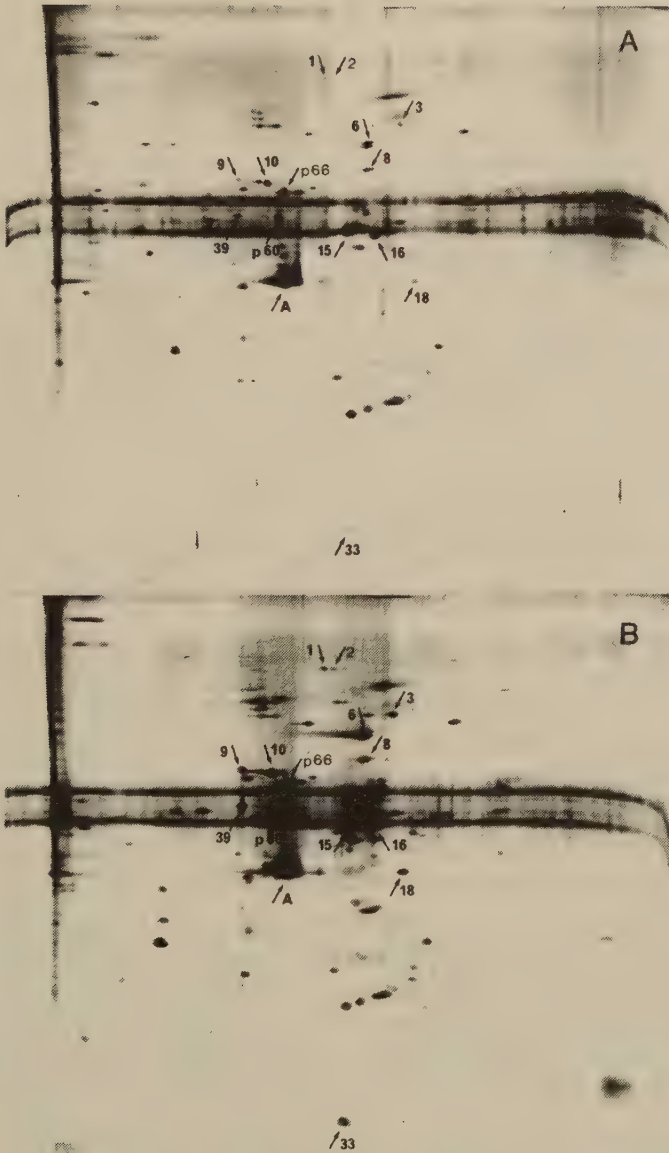


Abb.9. 2-D Proteinmuster von A) unstimulierten und B) PHA-stimulierten Lymphozyten des selben Individuums. Silberfärbung nach Heukeshoven. Quantitativ unterschiedlich ausgeprägte Proteine sind gekennzeichnet. Ihr MW und pI sind aus Tab.2 zu sehen.

3.4.2. Vergleich der 2-D Fluorogramme der ^3H -Leucin markierten Proteine PHA- und PWM-stimulierter Lymphozyten

Die 2-D Muster der zellulären ^3H -Leucin markierten Proteine von PHA- und PWM-stimulierten Lymphozyten wiesen eine große Ähnlichkeit auf. Im allgemeinen hatten die PHA-stimulierten Lymphozyten mehr ^3H -Leucin metabolisiert als die PWM-stimulierten Kulturen (siehe 3.1.3.), was sich in der Intensität der Fluorogramme widerspiegelt. Bei der vergleichenden Analyse der 2-D Muster wurde v.a. auf qualitative und auf in Relation zu den anderen Proteinen auffällige quantitative Unterschiede Wert gelegt. Deshalb wurde für den Vergleich der PHA- und PWM-Muster bei den PWM-Fluorogrammen eine längere Expositionszeit der Filme gewählt. Somit wurden unspezifische quantitative Unterschiede optisch ausgeglichen und die relativen quantitativen Unterschiede eindeutiger erkennbar.

Unabhängig von der insgesamt größeren metabolischen Aktivität konnten bei PHA-stimulierten Zellen drei Proteine (spot 11, 32 und 36) identifiziert werden, die verglichen mit PWM-stimulierten Lymphozyten relativ stärker markiert waren (siehe Abb.10).

Das Protein 11 mit MW 68 000 D war in Relation zu dem Referenzspot 13 nach PHA-Stimulierung offensichtlich intensiver ausgeprägt als nach PWM-Stimulierung.

Eine quantitative Erhöhung des Protein 32 mit MW 18 000 D ließ sich in Relation zu dem Referenzspot 31 eindeutig erkennen. Bei den PWM-Mustern war der spot 31 ungefähr gleich stark oder stärker markiert als das Protein 32, während in PHA-Mustern das Protein 32 die Spotstärke des Protein 31 zweifellos übertraf.

Das Protein 36 mit MW 13 000 D trat bei den PHA-Mustern als gut markierter spot im niedrigmolekularen Bereich in Erscheinung und konnte bei PWM-Mustern als offenbar schwächer markierter spot identifiziert werden. Dieser Unter-

schied wird in Abb.10 z.B. beim Vergleich mit dem Referenzspot 35 klar.

Neben diesen drei reproduzierbaren quantitativen Unterschieden konnten mitunter auch stärkere Ausprägungen in den Proteinen 23 mit MW 30 000 D, p 30 mit MW 30 000 D und 30 mit MW 17 000 D bei PHA-Mustern verglichen mit PWM-Mustern beobachtet werden. Diese und eventuell noch weitere quantitative Differenzen waren nicht reproduzierbar bei allen vergleichend mit PHA- und PWM-Stimulierung untersuchten Spendern zu finden. Sie mögen auf einer unterschiedlichen Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit PWM beruhen und sollten deshalb in diesem Zusammenhang als Tendenz genannt werden.

Ein qualitativer Unterschied in Form einer Variation im isoelektrischen Punkt eines Proteins (spot 20) zwischen PHA- und PWM-Mustern trat des öfteren, jedoch nicht in allen Versuchen auf. Das Protein 20 mit MW 39 000 D lag bei den PHA-stimulierten Lymphozyten meist weiter anodal als bei den PWM-stimulierten Zellen. Jedoch zeigte dieses Protein auch innerhalb der PHA- bzw. PWM-Muster gewisse Positionsunterschiede. Nach PHA-Stimulierung lag dieses Protein 20 immer anodal von spot p 40, meistens auch anodal von dem Referenzspot R_1 und in manchen Fällen sogar anodal von dem Referenzspot R_2 . Neben dem in Abb.10 gezeigten Beispiel sei zur Illustration der Variation dieses Proteins bei PHA-Stimulierung auf die Abb.15 verwiesen. Nach PWM-Stimulierung trat dieses Protein 20 immer kathodal von spot R_1 , dabei teils zwischen p 40 und R_1 und teils kathodal von p 40, auf. Bei dem Protein 20 scheint also eine mitogenabhängige Heterogenität verbunden mit einer individuellen Heterogenität (siehe 3.6.) vorzuliegen, wobei sich die Grenzbereiche der pI-Verteilung überschneiden.

In Tab.3 sind die qualitativen und quantitativen Unterschiede im Proteinmuster PHA- und PWM-stimulierter, ^3H -Leucin markierter Lymphozyten unter Angabe ihres ungefähren MW

und pI zusammengestellt. Nur die reproduzierbaren Differenzen wurden in die Tabelle aufgenommen.

Tab.3. Qualitative und quantitative Unterschiede im 2-D Proteinmuster ^3H -Leucin markierter Lymphozyten nach PHA- und PWM-Stimulierung.

spot	P H A		P W M	
	MW [kD]	pI	MW [kD]	pI
11	68	5.8		
20	39	5.5-6.0	39	6.0-6.3
32	18	6.25		
36	13	5.55		

Insgesamt gesehen zeigten also die 2-D Muster PHA- und PWM-stimulierter Zellen erstaunlich wenige Unterschiede. Theoretisch könnten quantitative Differenzen auf

- a) einem unterschiedlichen Anteil an stimulierten T- und B-Zellen,
- b) unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen oder
- c) unterschiedlichem Stimulierungsgrad der Zellen beruhen.

Die Frage nach einer T- bzw. B-Zellspezifität der beschriebenen Proteine wurde durch den Vergleich von PHA-stimulierten Lymphozyten (v.a. T-Zellen) mit EBV-transformierten Zelllinien (v.a. B-Zellen) analysiert (siehe 3.5.).

Die Frage, ob PHA-/ PWM-Muster einfach die Muster mehr oder weniger gut stimulierter Zellen reflektieren, wurde durch eine Analyse der 2-D Muster in Abhängigkeit von der PHA-Konzentration zu klären versucht (siehe 3.4.3.).

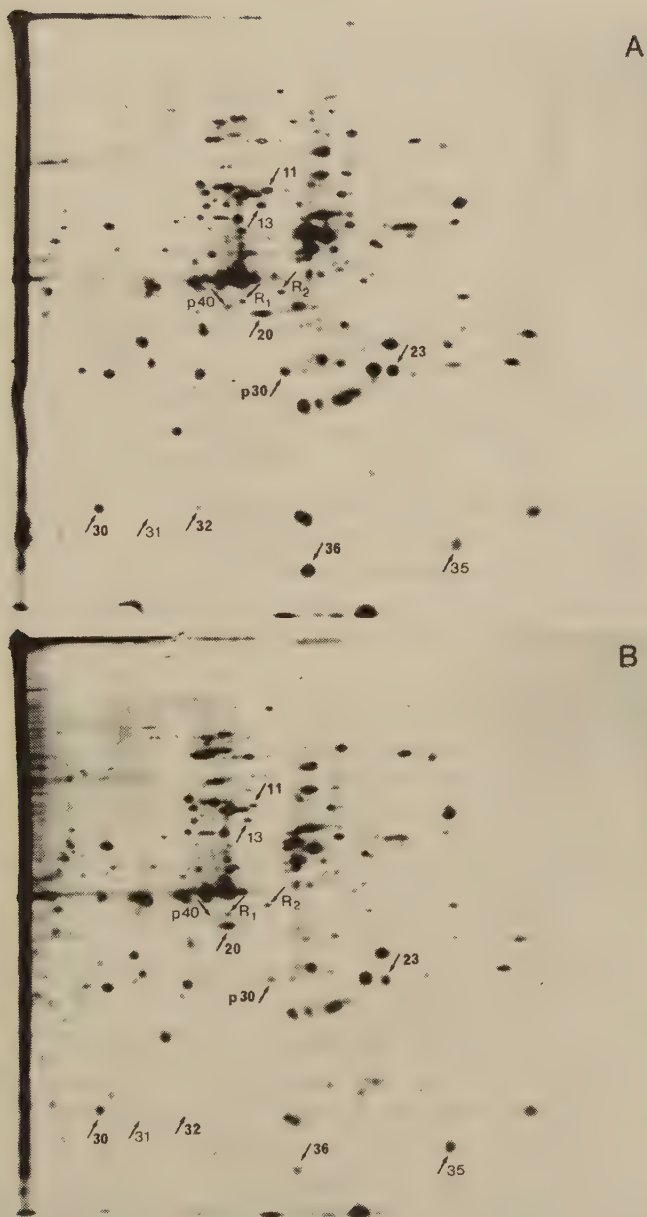


Abb.10. Legende siehe nächste Seite.

C

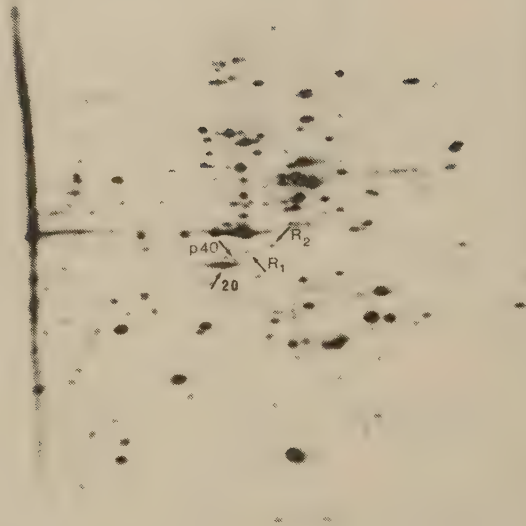


Abb.10. 2-D Fluorogramme von PHA-stimulierten Lymphozyten (A) und PWM-stimulierten Lymphozyten (B,C). Die drei reproduzierbaren quantitativen Unterschiede (spot 11, 32 und 36) und der qualitative Unterschied (spot 20) sind gekennzeichnet, sowie die nur teilweise beobachteten quantitativen Unterschiede (spot 30, p 30 und 23). A) und B) stellen die PHA- und PWM-Muster des selben Individuums dar. C) dient der Demonstration der Variabilität des Protein 20 bei PWM-Mustern. Zur Variationsbreite des spot 20 bei PHA-Mustern siehe Abb.15. Die MW und pI der Proteine sind der Tab.3 zu entnehmen. Die Proteinspots p 40, R_1 und R_2 dienen als Referenzproteine zur Lage des spot 20.

3.4.3. 2-D Fluorogramme von ^3H -Leucin markierten Lymphozyten in Abhängigkeit von der PHA-Konzentration

Unstimulierte Lymphozyten wurden nicht mit ^3H -Leucin markiert. Ein Vergleich von unstimulierten und PHA-stimulierten Lymphozyten fand deshalb nicht statt. Es ergaben sich jedoch interessante Aspekte bei der Analyse der 2-D Muster nach Kultivierung der Zellen bei steigenden PHA-Konzentrationen. Die Ergebnisse der 2-D Analysen PHA-stimulierter Lymphozyten angefangen bei einer Konzentration, die weit unterhalb des Stimulierungsoptimums liegt (2.5 $\mu\text{g/ml}$) bis zur optimalen Konzentration (10 $\mu\text{g/ml}$) sollen in diesem Kapitel vorgestellt werden.

Die gewonnenen Resultate sollten erstens Aufschluß darüber geben, welche Veränderungen im 2-D Muster bei steigender PHA-Konzentration und damit bei zunehmender Stimulierung der Zellen stattfinden. Zweitens sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie die Unterschiede zwischen PHA- und PWM-Mustern zu bewerten sind.

In Abb.11 sind die 2-D Fluorogramme der Lymphozyten des selben Individuums nach Stimulierung mit 2.5 $\mu\text{g PHA/ml}$ (A), 5 $\mu\text{g PHA/ml}$ (B) und 10 $\mu\text{g PHA/ml}$ (C) vergleichend dargestellt.

Da die Kulturen mit steigender PHA-Konzentration eine insgesamt zunehmende metabolische Aktivität aufwiesen, wurden 2-D Fluorogramme mit unterschiedlichen Expositionszeiten für den Vergleich herangezogen. Damit konnte ein spezifisches Ansteigen von einigen Proteinspots im Zuge der Stimulierung optisch deutlicher gemacht werden.

Mit steigender PHA-Konzentration war eine quantitative Erhöhung von Proteinen beobachtet worden, die in vier Kategorien eingeteilt werden konnten:

Erstens fand man eine zunehmende Intensität bei Proteinen, deren Ansteigen auch beim Vergleich von unstimulierten und

PHA-stimulierten Lymphozyten in silbergefärbten Gelen aufgefallen war. Es handelt sich um die Proteine 1 (MW 150 000 D), 3 (MW 100 000 D), 6 (MW 88 000 D), 9 (MW 70 000 D), 10 (MW 69 000 D), 39 (MW 60 000 D), p 60 (MW 60 000 D), 18 (MW 45 000 D) und 33 (MW 17 000 D/16 000 D). Dabei stiegen die Proteine 1, 3, 6, 8, p 60 und 33 eher kontinuierlich an, während die Proteine 9, 10, 39 und 18 erst bei einer PHA-Konzentration von 10 µg/ml deutlich erhöht waren.

Zweitens konnte eine quantitative Erhöhung der drei Proteine beobachtet werden, deren unterschiedliche Ausprägung beim Vergleich von PHA- und PWM-Fluorogrammen reproduzierbar gefunden wurde (Protein 11, 32 und 36). Bei den Proteinen 11 (MW 68 000 D) und 36 (MW 13 000 D) war ein kontinuierliches Anwachsen zu verzeichnen, während das Protein 32 (MW 18 000 D) erst bei 10 µg/ml eine auffallende Intensität erreichte.

Drittens wurde mit wachsender PHA-Konzentration eine stärkere Markierung auch bei solchen Proteinen beobachtet, bei denen eine quantitative Erhöhung in den silbergefärbten Gelen wegen schlechter Anfärbbarkeit oder schlechter Reproduzierbarkeit der Färbung nicht zu erkennen war, oder deren unterschiedliche Ausprägung beim Vergleich von PHA- und PWM-Fluorogrammen nur teilweise gefunden wurde. Eindeutig erkennbar stiegen die Proteine 21 (MW 34 000 D), 23 (MW 30 000 D), p 30 (MW 30 000 D) und 25 (MW 29 000 D) an. Die Unterschiede wurden v.a. beim Vergleich mit der Intensität von jeweiligen Nachbarproteinen offensichtlich. Ebenso schienen die Proteine 30 (MW 17 000 D), 34 (MW 17 000 D) und 35 (MW 14 000 D) bei hoher PHA-Konzentration spezifisch stärker markiert zu werden, was beim Vergleich mit dem in Abb.11 eingezeichneten Referenzprotein R zu erkennen ist.

Viertens stieg die Spotstärke des Protein 12 (MW 67 000 D) an, dessen quantitative Erhöhung weder bei den silbergefärbten Gelen noch bei den PHA/PWM-Fluorogrammen beobach-

tet wurde.

In Tab.4 sind die mit steigender PHA-Konzentration stärker markierten Proteine mit ihrem MW und ihrem pI aufgelistet.

Tab.4. Mit wachsender PHA-Konzentration zunehmend stärker mit ^3H -Leucin markierte Proteine.

spot	MW [kD]	pI
1	150	5.8
3	100	5.3
6	88	5.45-5.55
8	76	5.5
9	70	6.3
10	69	6.15
11	68	5.8
12	67	6.25
39	60	6.3
p 60	60	6.05
18	45	5.2
21	34	5.05
23	30	5.05
p 30	30	5.7
25	29	6.25
30	17	6.8
32	18	6.25
33	17/16	5.6
34	17	4.2
35	14	4.6
36	13	5.55

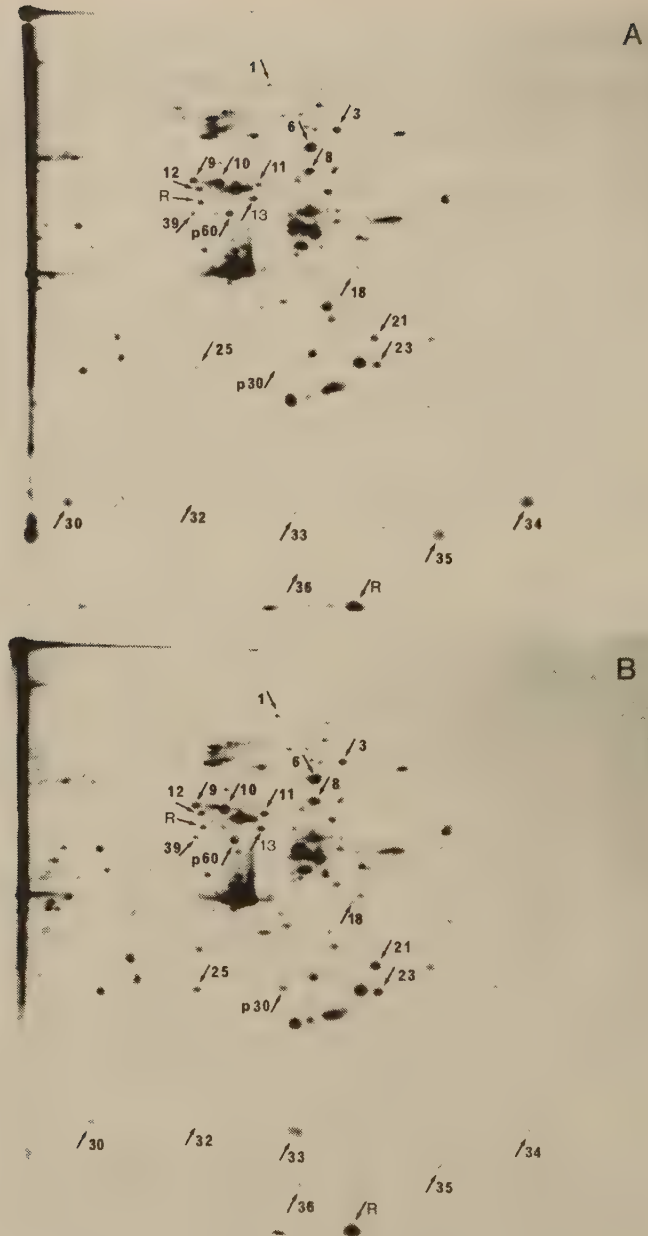


Abb.11. A) und B) Legende siehe nächste Seite

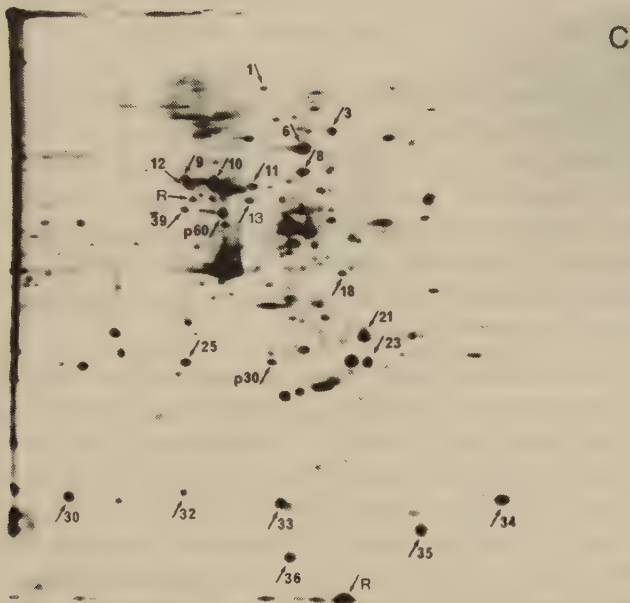


Abb.11. 2-D Fluorogramme von ^3H -Leucin markierten Lymphozyten nach Stimulierung mit A) 2.5 μg PHA/ml, B) 5 μg PHA/ml und C) 10 μg PHA/ml. Die mit steigender PHA-Konzentration quantitativ erhöhten Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die MW und pI sind aus Tab.4 abzulesen.

3.4.4. Vergleich der 2-D Fluorogramme von LPS-behandelten und PHA-stimulierten Lymphozyten

Wie schon aus den Einbauraten zu ersehen war, hatten die mit LPS behandelten Lymphozyten sehr wenig ^3H -Leucin metabolisiert. Dies spiegelt sich auch in sehr schwach markierten Fluorogrammen und sehr langen Expositionszeiten wieder. In Abb.12 sind vergleichend die Fluorogramme von LPS-behandelten Lymphozyten nach ca. 3 Wochen Exposition und von PHA-stimulierten Lymphozyten nach 2 Tagen Exposition des selben Individuums dargestellt.

Von einer extrem schwächeren Markierung bei LPS-Behandlung waren nicht alle Proteine gleichmäßig betroffen, sondern die Markierung von Proteinen beschränkte sich auf nur wenige spots. Die relative Markierung der Proteine untereinander unterschied sich also stark von dem von PHA-stimulierten Lymphozyten gewohnten 2-D Mustern. So war bei den Proteinen 4, 6, 10 und 12 ein relativ guter ^3H -Leucin Einbau nach LPS-Behandlung zu beobachten, während die übrigen Proteine relativ schwach markiert wurden und sich im wesentlichen auf einen MW-Bereich von ca. 30 kD - 150 kD beschränkten.

Inwieweit die Proteinmuster der LPS-behandelten Lymphozyten als Muster unstimulierter Lymphozyten betrachtet werden können, oder ob, wenn auch keine Stimulierung, so doch Reaktionen des LPS mit der Zelle und entsprechende Veränderungen in zellulären Proteinen stattfanden, ist schwer zu entscheiden. Jedoch sei darauf hingewiesen, daß unstimulierte und LPS-behandelte Lymphozyten in silbergefärbten Gelen keine Unterschiede erkennen ließen.

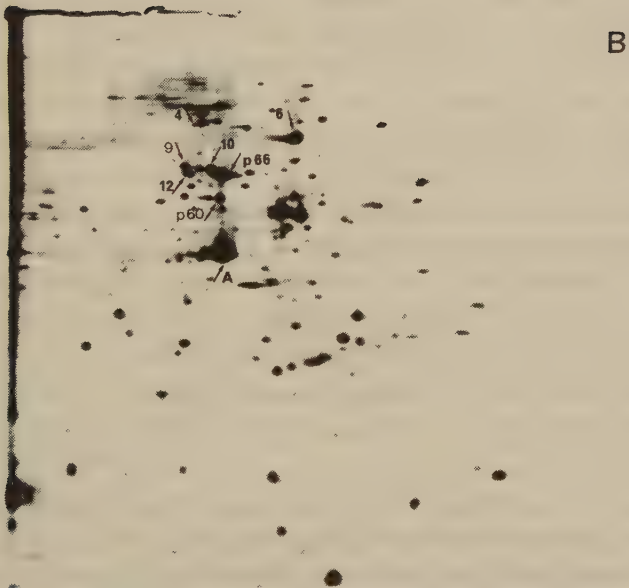
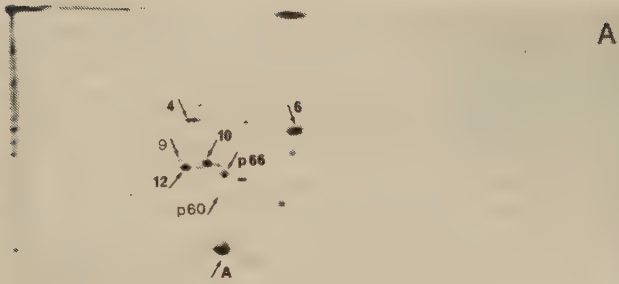


Abb.12. 2-D Fluorogramme von A) LPS-behandelten und B) PHA-stimulierten Lymphozyten. Nach LPS-Behandlung relativ gut markierte Proteine sind gekennzeichnet.

3.5. Vergleich des 2-D Musters von PHA-stimulierten Lymphozyten und EBV-transformierten lympho- blastoiden Zelllinien

Die vergleichende Analyse von PHA-stimulierten Lymphozyten und EBV-transformierten Zelllinien wurde

- a) in Hinblick auf eine mögliche Identifizierung von T- und B-Zell spezifischen Proteinen und
- b) in Hinblick auf die Zuordnung der bei Stimulierung spezifisch erhöhten Proteine zu T- und/oder B-Zell spezifischen Proteinen durchgeführt.

Es wurde deshalb kein Wert auf Unterschiede zwischen den 7 untersuchten Zelllinien selbst gelegt, sondern nur auf Unterschiede, die beim Vergleich aller Zelllinien mit den stimulierten Lymphozyten immer auftraten. Da die EBV-transformierten Zellen eine sehr hohe metabolische Aktivität aufwiesen, wurden für den Vergleich vor allem gut markierte Zellysate von PHA-stimulierten Lymphozyten herangezogen.

In Abb.13 werden die 2-D Proteinmuster einer lymphoblastoiden Zelllinie (HWL 2) und von PHA-stimulierten Lymphozyten vergleichend dargestellt.

Einige auffallende quantitative Unterschiede waren zu beobachten, wobei einerseits eine stärkere Markierung von 5 Proteinen bei PHA-Stimulierung und andererseits umgekehrt eine quantitative Erhöhung in 4 Proteinen bei EBV-transformierten Zellen gefunden wurde.

Bei PHA-stimulierten verglichen mit EBV-transformierten Zellen intensiver ausgeprägt waren die Proteine 4, 7, 28, 30 und 32.

Das Protein 4 mit MW 96 000 D stellte ein in 2-D Fluorogrammen PHA-stimulierter Lymphozyten relativ stark markiertes Protein dar, das bedingt durch eine Ladungsheterogenität in mindestens zwei nebeneinanderliegenden spots erschien.

Bei den lymphoblastoiden Zelllinien wurde eine geringere Intensität dieses Proteins beobachtet.

Das Protein 7 mit MW 80 000 D trat ebenfalls in PHA-Fluorogrammen meist in zwei nebeneinanderliegenden spots auf und war bei den lymphoblastoiden Zelllinien nur ganz schwach ausgeprägt.

Die stärkere Markierung des Protein 28 mit MW 22 000 D bei PHA-stimulierten Zellen wird im Vergleich zu dem darunterliegenden Referenzspot offensichtlich.

In Relation zu dem Referenzspot 29 war die quantitative Erhöhung des Protein 30 mit MW 17 000 D und des Protein 32 mit MW 18 000 D ebenfalls klar zu erkennen.

Die Proteine 19, 24, 26 und 27 erschienen umgekehrt bei den Fluorogrammen EBV-transformierter Zelllinien stärker markiert.

Das Protein 19 mit MW 39 000 D trat bei den EBV-transformierten Zellen als ziemlich stark markierter Proteinspot in Erscheinung, während er bei den PHA-stimulierten Zellen entweder nur sehr schwach markiert oder überhaupt nicht zu identifizieren war.

Das bei den EBV-Zellen quantitativ erhöhte Protein 24 mit MW 29 000 D trat bei einer Zelllinie sogar als auffallender Doppelspot auf (Robert) und war bei Sabrina und Raji sogar noch stärker markiert als in dem gezeigten Beispiel der Zelllinie HWL 2.

Bei den EBV-Zellen besaß weiterhin das Protein 26 mit MW 28 000 D eine offensichtlich stärkere Markierung. Seine Intensität war hier mit der des Protein p 30 vergleichbar, während bei PHA-stimulierten Zellen das Protein 26 nur schwach markiert wurde.

Das letzte, bei den EBV-transformierten Zellen stärker markierte Protein, das Protein 27 mit MW 23 000 D, liegt in der Nachbarschaft des Protein 28, dessen größere Intensität bei PHA-stimulierten Zellen oben beschrieben wurde.

Neben diesen spezifischen quantitativen Unterschieden im 2-D Muster PHA-stimulierter und EBV-transformierter Zellen konnte bei den EBV-transformierten Zelllinien auch eine sehr starke Ausprägung in vielen Proteinen verzeichnet werden, deren quantitative Erhöhung nach Stimulierung beobachtet wurde. So waren die Proteine 1, 3, 8, 9, 10, 11, 39, p 60, 18, 21 und 23 verglichen mit den PHA-Mustern genauso stark oder teilweise stärker markiert. Diese Proteine traten also nicht nur nach PHA-Stimulierung (T-Zellen), sondern auch bei transformierten B-Zellen mit großer Intensität auf. Eine quantitativ starke Ausprägung konnte bei den Proteinen 30 und 32 in den 2-D Mustern EBV-transformierter Zelllinien nicht beobachtet werden. Diese beiden Proteine scheinen also spezifisch für stimulierte T-Zellen zu sein.

Die bisher beschriebenen Unterschiede stellten rein quantitative Variationen im Proteinstern dar. Bei zwei weiteren Proteinen konnte eine Kombination aus quantitativen und qualitativen Variationen beobachtet werden. Es handelt sich um die Proteine 34 (MW 17 000 D) und 35 (MW 14 000 D). In den PHA-Mustern war immer ein sehr stark markiertes Protein 34 zu beobachten, das von einem sehr schwach markierten spot mit etwas höherem pI und gleichem MW begleitet wurde (34 z). In den EBV-Mustern ging mit einer schwächeren Markierung des Protein 34 eine stärkere Markierung dieses Zusatzspots 34 z einher. Meist waren sogar beide Proteine ungefähr gleich stark markiert. Das Protein 35 zeigte eine andere qualitative Variation. Während in den PHA-Mustern das Protein 35 stark markiert erschien und darüber ein kleiner Zusatzspot mit etwas höherem MW zu beobachten war (35 z), lag die Intensität des Protein 35 in den EBV-Mustern deutlich darunter und der Zusatzspot mit höherem MW war dementsprechend stärker markiert. Die Intensität der Proteine 35 und 35 z war in den B-Zelllinien im allgemeinen gleich.

Schließlich konnte noch ein qualitativer Unterschied im niedrigmolekularen Bereich beobachtet werden. Ein Protein mit ca. 20 000 D (spot 40) trat nur bei den EBV-transformierten Zelllinien auf. Es handelt sich um ein schwach markiertes Protein, dessen Ab- oder Anwesenheit nur nach längeren Expositionszeiten der Filme eindeutig zu erkennen war. Da dieses Protein 40 in den relativ kurz exponierten Fluorogrammen der Abb.13 A) und B) nicht leicht zu identifizieren ist, werden Ausschnitte aus den 2-D Fluorogrammen nach längerer Expositionszeit in den Abb.13 C) und D) gezeigt, die die unterschiedliche Expression des Proteins deutlich machen. Es kann sich um einen echten qualitativen Unterschied in Bezug auf Anwesenheit (EBV) oder Abwesenheit (PHA) eines Proteins handeln oder um einen quantitativen Unterschied wie bei den anderen beschriebenen Proteinvariationen, wobei die quantitative Ausprägung bei den PHA-Mustern unterhalb der Detektionsgrenze der Fluorographie liegt.

Die in der Abb.13 als qualitative oder quantitative Variationen zwischen den 2-D Mustern PHA-stimulierter und EBV-transformierter Zellen gekennzeichneten Proteine sind in Tab.5 unter Angabe ihrer MW und pI zusammengestellt. Die Tab.5 enthält nur die Proteine mit spezifischen Unterschieden zwischen den PHA- und EBV-Mustern. Die Proteine, die nur tendenziös im Sinne einer besseren Stimulierung bei den EBV-transformierten Zellen erhöht erschienen, sind weder in der Tabelle noch in der Abbildung angegeben.

Tab.5. Spezifische qualitative und quantitative Unterschiede im 2-D Proteinmuster ^3H -Leucin markierter, PHA-stimulierter Lymphozyten und EBV-transformierter Zelllinien.

spot	P H A		E B V	
	MW [kD]	pI	MW [kD]	pI
4	96	6.2/6.25		
7	80	6.15/6.2		
19			39	6.6
24			29	4.9
26			28	5.8
27			23	6.45
28	22	6.35		
40			20	6.1
30	17	6.8		
32	18	6.25		
34	17	4.2	17	4.3/4.2
35	14	4.6	16/14	4.6

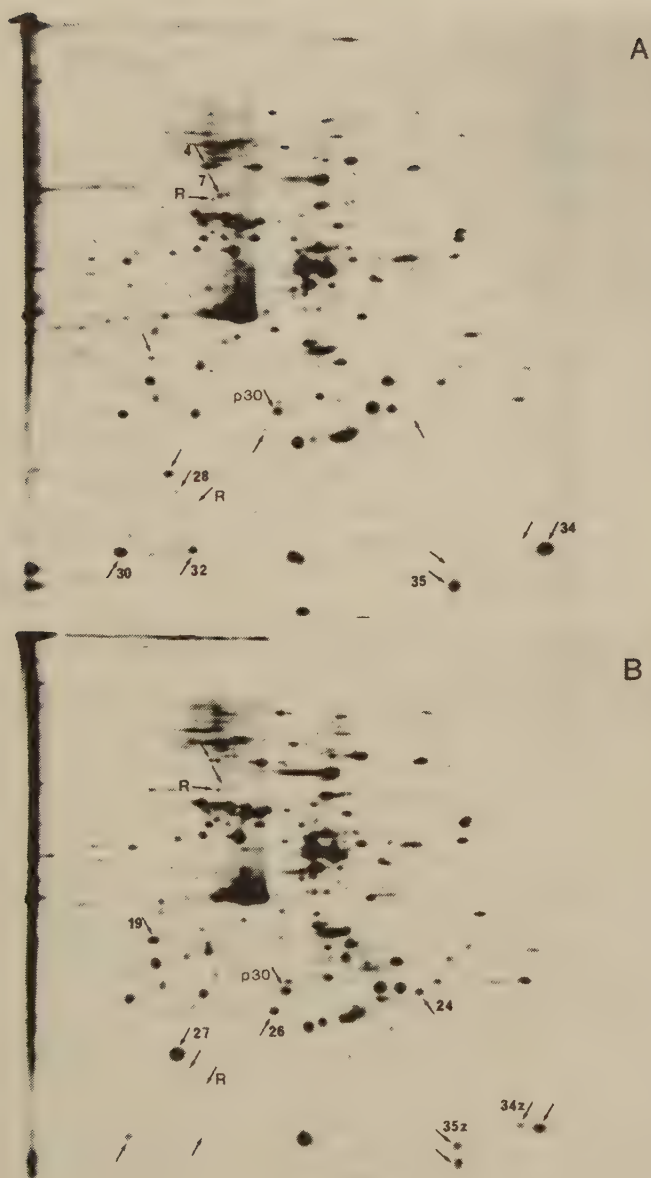


Abb.13. A) und B) Legende siehe nächste Seite.

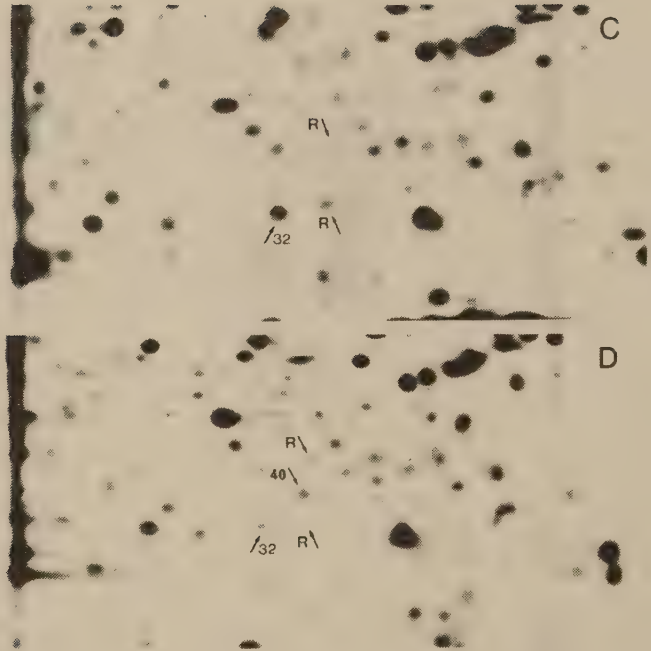


Abb.13. 2-D Fluorogramme von PHA-stimulierten Lymphozyten (A,C) und EBV-transformierten lymphoblastoiden Zellen (B,D). A) und B) stellen Gesamtfluorogramme und C) und D) Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen dar. Die gekennzeichneten Unterschiede im 2-D Muster sind in Tab.5 unter Angabe des MW und pI der Proteine zusammengestellt. R dienen v.a. als Referenzproteine zur Veranschaulichung quantitativer Differenzen. A) und B): Expositionen 4 bzw. 3 Tage. C) und D): Expositionen 9 bzw. 8 Tage

3.6. Individuelle Unterschiede im 2-D Muster zellulärer Proteine

Bis jetzt wurden die 2-D Muster in Hinblick auf methodische Unterschiede bei verschiedenen Arten der Visualisierung der Proteine und in Hinblick auf differierende Zellkultivierung (unstimulierte Lymphozyten, mitogenstimulierte Lymphozyten, EBV-transformierte Zelllinien) beschrieben. Nun soll die Frage erörtert werden, ob und welche individuellen Variationen im Proteinmuster existieren.

Für die Analyse individueller Unterschiede wurden 2-D Fluorogramme der Zellysate von ^3H -Leucin markierten, PHA-stimulierten Lymphozyten mehrerer Spender vergleichend ausgewertet. Die 2-D Muster verschiedener Individuen wiesen eine überraschend große Ähnlichkeit auf. Die wenigen beobachteten individuellen Unterschiede können in quantitative und qualitative Variationen eingeteilt werden. Es werden nur reproduzierbare individuelle Variationen beschrieben, d.h. solche, die bei allen durchgeführten 2-D Elektrophoresen eines Individuums immer wieder auftraten.

3.6.1. Quantitative individuelle Unterschiede

Geringfügige quantitative individuelle Variationen waren zu beobachten. Erstens betrafen sie solche Proteine, deren Ansteigen nach Mitogenstimulierung beschrieben wurde (siehe 3.4.1. und 3.4.3.) und dabei vor allem die Proteine 3, 6, 8, 12 und 32. Diese quantitativen individuellen Variationen könnten also individuelle Unterschiede in der Stimulierbarkeit der Lymphozyten widerspiegeln.

Weiterhin traten individuelle Variationen in der quantitativen Ausprägung des Proteins 17 mit MW 46 000 auf. Dieses Protein war bei kurzen Expositionszeiten meist kaum zu identifizieren, zeigte aber bei manchen Spendern annähernd

die Spotstärke des benachbarten Proteins 18. Diese quantitative Variation wird nicht in einer eigenen Abbildung dargestellt. Sie ist in Abb.17 (Kap.3.6.3.) und in Abb.40 (Kap.3.8.2.) zu sehen, wobei im ersten Fall ein Beispiel für eine schwache Ausprägung und im zweiten Fall ein Beispiel für eine starke Ausprägung des Protein 17 gegeben ist.

3.6.2. Qualitative individuelle Unterschiede

Prinzipiell ließen sich qualitative individuelle Variationen im 2-D Proteinmuster folgendermaßen differenzieren:

- a) Unterschiede in Bezug auf An- oder Abwesenheit von Proteinen,
- b) Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen mit diffuser individueller Ausprägung und
- c) Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen mit dem Auftreten von mindestens zwei verschiedenen definierbaren Varianten eines Proteins, wobei ein Individuum entweder nur eine oder beide Varianten nebeneinander exprimieren kann.

Diese drei Typen von qualitativen Variationen sollen nun im einzelnen vorgestellt werden.

- a) Unterschiede in Bezug auf An- oder Abwesenheit von Proteinen

Im Molekulargewichtsbereich um 45 000 D traten im 2-D Muster im pH-Bereich zwischen der Kathode (pH ca. 7.0) und dem Aktin (pH ca. 6.0) individuell unterschiedliche Proteinspots auf. In Abb.14 sind einige Beispiele für die individuelle Ausprägung von Proteinen in diesem Bereich zusammengestellt.

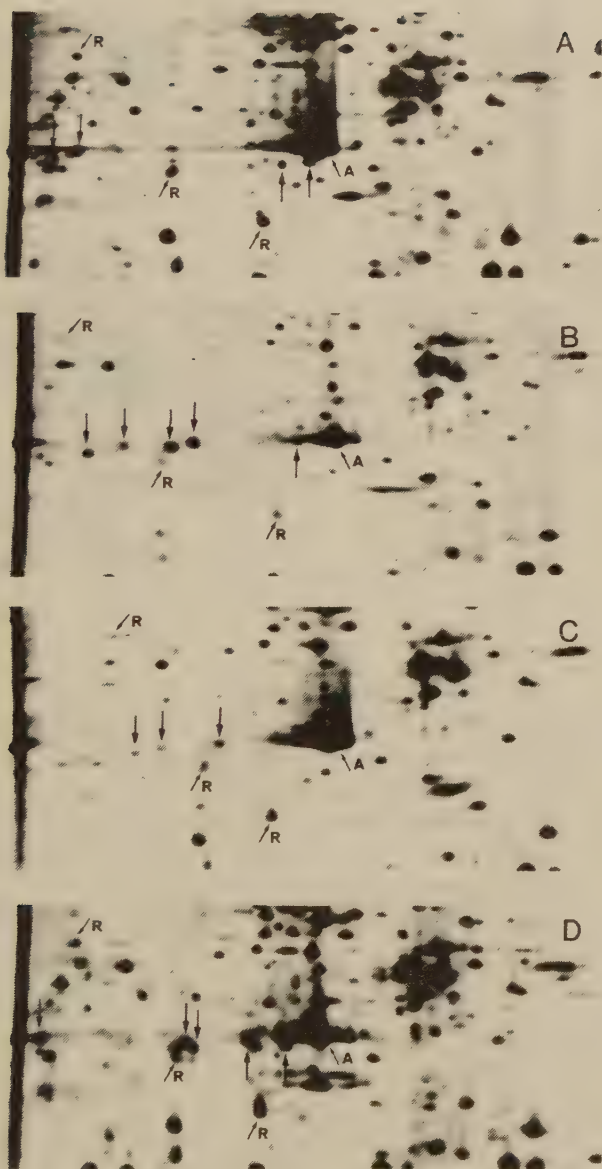


Abb.14. Legende siehe nächste Seite.

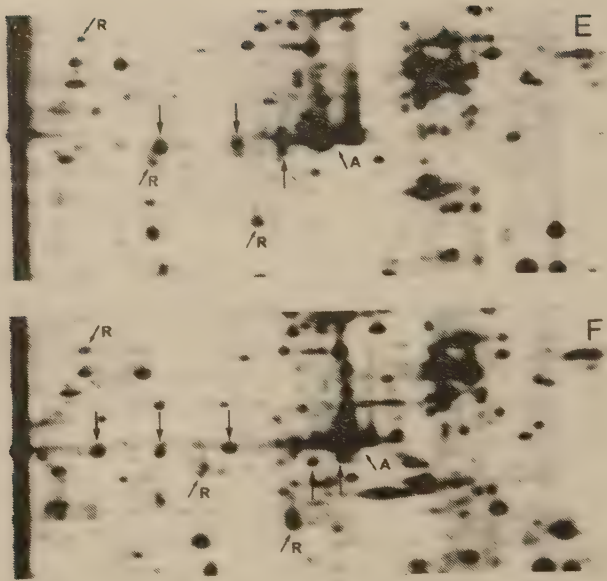


Abb.14. A) bis F):

Individuelle Variationen von Proteinen im MW-Bereich von 45 000 D. Gezeigt sind jeweils Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen mit MW von ca. 30 kD bis 70 kD und einem pH-Bereich von ca. 7.0 bis 5.0. Die An- oder Abwesenheit der mit Pfeilen gekennzeichneten Proteine wird in Bezug zu den angegebenen Referenzspots ersichtlich.

b) Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen mit diffuser individueller Ausprägung

Ein Protein mit MW 39 000 D (spot 20) trat mit großer individueller Variabilität über einen relativ weiten pH-Bereich verstreut auf. Eine unterschiedliche Ausprägung dieses Proteins 20 wurde schon beim Vergleich von PHA- mit PWM-stimulierten Lymphozyten beschrieben (siehe 3.4.2.). Auch beim Vergleich von PHA-stimulierten Lymphozyten mehrerer Individuen variierte die Lage dieses Proteins beträchtlich, wobei es im allgemeinen eine anodälere Position als bei den PWM-Mustern einnahm.

In Abb.15 sind einige Beispiele für die pI-Heterogenität dieses Proteins zusammengestellt.

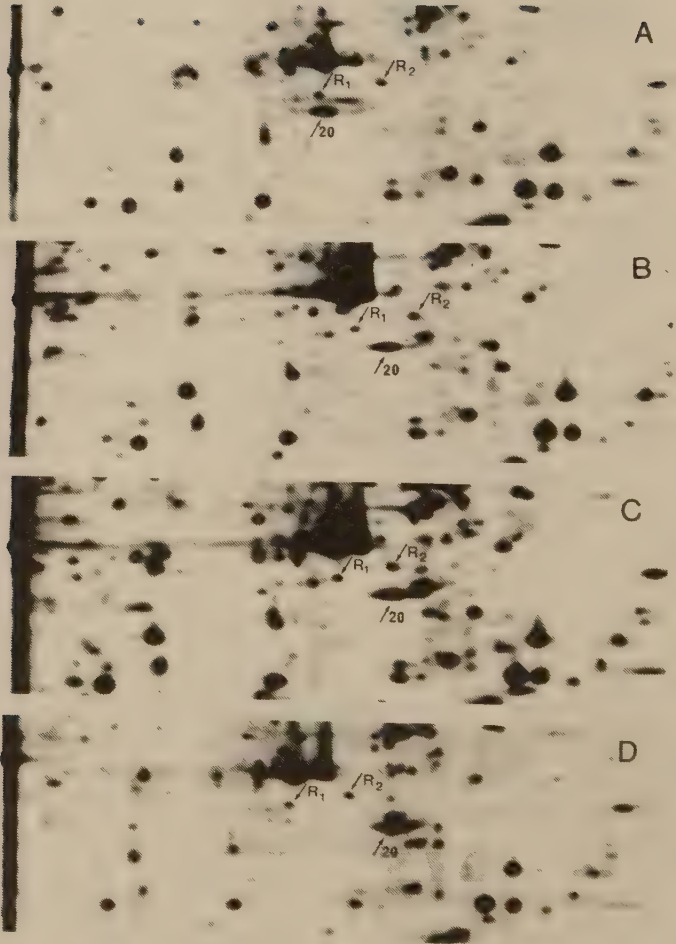


Abb.15. Unterschiedliche elektrophoretische Mobilität des Proteins 20 (MW 39 000 D) dargestellt am Beispiel von Ausschnitten aus 2-D Fluorogrammen von 4 Individuen.

- A) Lage des spot 20 unterhalb des Referenzspots R_1 .
- B) Lage des spot 20 zwischen R_1 und R_2 .
- C) Lage des spot 20 unterhalb R_2 .
- D) Lage des spot 20 rechts (anodal) von R_2 .

c) Individuelle Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen mit definierbaren Proteinvarianten

Unter den insgesamt ca.400 identifizierbaren Proteinen im 2-D Muster PHA-stimulierter Lymphozyten befanden sich 6 Proteine, die in zwei (oder mehreren) definierbaren IEF-Varianten auftraten. Nur in 10% SDS-Polyacrylamidgelen konnten alle 6 varianten Proteine eindeutig identifiziert werden. Wie unter 3.2.1. erwähnt, erhielten diese varianten Proteine eine Nomenklatur, die das MW in kD anzeigt. Am Beispiel eines 2-D Fluorogrammes sind diese 6 Proteine (p 23, p 30, p 40, p 60, p 66 und p 75) in Abb.16 gezeigt. Die einzelnen Varianten dieser Proteine sollen nun im einzelnen genauer beschrieben werden.

Das Protein p 23 mit MW 23 000 D stellt ein relativ schwach markiertes Protein im 2-D Muster dar. Für eine eindeutige Identifizierung wurden meist längere Expositionszeiten benötigt. Dieses Protein tritt in zwei IEF-Varianten auf, einer sauren (acidic) Variante p 23 - a mit einem pI von 5.5 und einer basischen (basic) Variante p 23 - b mit einem pI von 5.6. Es konnten drei verschiedene Phänotypen p 23 - a, p 23 - ab und p 23 - b beobachtet werden. Individuen mit dem Phänotyp p 23 - a exprimieren nur die saure Variante des Proteins, beim Phänotyp p 23 - ab können beide Varianten p 23 - a und - b nebeneinander beobachtet werden und der Phänotyp p 23 - b ist durch das alleinige Auftreten der basischen Variante gekennzeichnet. Beim Phänotyp p 23 - ab waren die beiden Proteinspots deutlich schwächer ausgeprägt als der allein auftretende spot p 23 - a oder p 23 - b bei den zwei anderen Phänotypen. Die Abb.16 zeigt den Phänotyp p 23 - b, während die übrigen Phänotypen unter Kap.3.8. in den Abb.19-22 illustriert sind.

Das Protein p 30 mit MW 30 000 D kommt ebenso in zwei IEF-Varianten vor, einer sauren Variante p 30 - a (pI 5.7) und

einer basischen Variante p 30 - b (pI 6.0). Nur zwei unterschiedliche Phänotypen dieses Proteins konnten beobachtet werden, und zwar ein häufiger Phänotyp p 30 - a und ein sehr seltener Phänotyp p 30 - ab, wobei ersterer durch alleinige Expression der sauren Variante und der zweite durch gleichzeitige Expression beider Varianten charakterisiert ist. Aufgrund des Fehlens eines dritten Phänotyps erscheint vielleicht die Zuordnung des Proteins p 30 - b als Variante des Proteins p 30 - a zunächst nicht eindeutig. Das Protein p 30 - b könnte auch als zusätzlicher Proteinspot beschrieben werden und damit zur Klasse der individuellen Variationen in Bezug auf An- oder Abwesenheit eines Proteins zugeordnet werden. Die Identifizierung des Proteins p 30 - b als IEF-Variante des Proteins p 30 - a erfolgte aufgrund der deutlich verminderten quantitativen Ausprägung des p 30 - a Proteinspots bei dem Phänotyp p 30 - ab verglichen mit dem Phänotyp p 30 - a. Das 2-D Fluorogramm in Abb.16 zeigt den häufigen Phänotyp p 30 - a. Zur vergleichenden Darstellung beider Phänotypen sei auf Abb.24 in Kap.3.8. hingewiesen.

Das Protein p 40 mit MW 40 000 D ist als relativ kleiner Proteinspot direkt unterhalb des Aktins zu erkennen. Es besitzt ebenfalls zwei verschiedene IEF-Varianten, eine saure Variante p 40 - a (pI 6.1) und eine basische Variante p 40 - b (pI 6.2). Hier konnten die drei Phänotypen p 40 - a, p 40 - ab und ein seltener Phänotyp p 40 - b unterschieden werden. Die beiden Proteinspots p 40 - a und - b waren beim Phänotyp p 40 - ab verglichen mit den beiden anderen Phänotypen quantitativ reduziert. In Abb.16 liegt der häufige Phänotyp p 40 - a vor. Eine vergleichende Darstellung aller drei Phänotypen wird in Abb.27 in Kap.3.8. gegeben.

Das Protein p 60 mit MW 60 000 D zählt zu den prominenten Proteinspots auf 2-D Fluorogrammen. Sein quantitatives Ansteigen nach Mitogenstimulierung wurde bereits beschrieben (siehe 3.4.). Daneben wurden bei diesem Protein zwei ver-

schiedene IEF-Varianten gefunden, wiederum eine saure Variante p 60 - a (pI 6.05) und eine basische Variante p 60 - b (pI 6.2), die in zwei unterschiedlichen Phänotypen auftraten, und zwar einem häufigen Phänotyp p 60 - a und einem seltenen Phänotyp p 60 - ab. Ähnlich wie beim Protein p 30, das auch nur in zwei Phänotypen vorkam, erfolgte die Zuordnung des p 60 - b als basische Variante des p 60 - a aufgrund der offensichtlich verminderten quantitativen Ausprägung des p 60 - a spots beim Phänotyp p 60 - ab verglichen mit dem Phänotyp p 60 - a. Die Abb.16 zeigt den häufigen Phänotyp p 60 - a, während beide Phänotypen vergleichend in Abb.29 zu sehen sind (Kap.3.8.).

Das Protein p 66 mit MW 66 000 D fiel ebenso als stark markiertes Protein im 2-D Muster auf. Es liegt direkt überhalb dem soeben beschriebenen p 60 und besitzt wiederum eine saure Variante p 66 - a (pI 6.0) und eine basische Variante p 66 - b (pI 6.15). Drei verschiedene Phänotypen, und zwar ein häufiger Phänotyp p 66 - a, der Phänotyp p 66 - ab und ein seltener Phänotyp p 66 - b, konnten beobachtet werden. Wiederum zeigten sich quantitative Unterschiede in der Ausprägung der Proteinspots beim Vergleich der Phänotypen p 66 - a bzw. - b mit dem Phänotyp p 66 - ab. Die Abb.16 stellt den häufigsten Phänotyp p 66 - a vor. Für eine vergleichende Darstellung aller drei Phänotypen kann auf die Abb.29 - 30 verwiesen werden (Kap.3.8.).

Das Protein p 75 mit MW 75 000 D zählt zu den relativ schwach markierten Proteinen auf 2-D Fluorogrammen. Die Variationen in diesem Protein waren wesentlich komplexer als bei den bisher beschriebenen Proteinen. Das p 75 erscheint in mindestens drei verschiedenen IEF-Varianten, die zusätzlich zur Variation im pI auch geringe Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität im SDS-Gel aufweisen. Durch eine bessere Auftrennung der Proteine mit höheren Molekulargewichten in 10% SDS-Gelen vergli-

chen mit Gradientengelen von 7.5% - 20% konnten erst bei Analyse dieser Proteinvariation in 10% Gelen die drei IEF-Varianten aufgrund ihrer zusätzlichen MW-Variation eindeutig identifiziert werden. Daraus ergab sich das Auftreten einer sauren Variante p 75 - a (MW 77 000 D, pI 5.3), einer zentralen (central) Variante p 75 - c (MW 75 000 D, pI 5.35) und einer basischen Variante p 75 - b (MW 76 000 D, pI 5.4). Die Nomenklatur erfolgte nach dem MW der häufigsten Variante c. Unter Annahme von drei IEF-/MW-Varianten konnten dann 6 verschiedene Phänotypen (p 75 - a, p 75 - b, p 75 - c, p 75 - ab, p 75 - ac und p 75 - bc) unterschieden werden. Die Komplexität dieses Proteinmusters wird noch verstärkt durch die Beobachtung, daß das p 75 Protein immer in Begleitung von zwei schwächer markierten Proteinspots mit etwas höherem MW auftrat. Diese zusätzlichen Proteinspots besitzen immer den selben IEF-Typ wie das p 75 Protein und spiegeln ebenso die leichten MW-Unterschiede der Varianten wieder. Im 2-D Muster sind dann nicht wie bei den anderen varianten Proteinen "Einspot"- bzw. "Zweispot"-Muster zu erkennen, sondern charakteristische "Dreispot"-Muster (p 75 - a, - b, - c) bzw. "Sechsspot"-Muster (p 75 - ab, - ac, - bc).

Zuletzt sprachen die Ergebnisse aus der vergleichenden Analyse der Phänotypen weiterer Individuen dafür, daß eventuell zusätzliche IEF-Varianten diskutiert werden müssen. Es waren Phänotypen zu beobachten, die eine basischere Variante als p 75 - b zu exprimieren schienen, die als p 75 - d bezeichnet werden könnte. Weiterhin traten Phänotypen mit einer Variante (p 75 - e) auf, deren pI zwischen der a- und der c-Variante lag. In einem Fall schien die saure Variante weiter anodal als die a-Variante zu liegen, so daß evtl. noch eine weitere Variante (p 75 - f) angenommen werden muß (siehe 3.8.).

In Abb.16 ist der relativ häufige Phänotyp p 75 - ac zu sehen. Die weiteren Phänotypen sind in den Abb.30-39 dargestellt (Kap 3.8.).

In Tab.6 sind alle beschriebenen varianten Proteine unter Angabe ihrer MW und pI-Werte zusammengestellt. Bei dem Protein p 75 wurden nur die sicher identifizierten Varianten berücksichtigt.

Tab.6. Proteine im 2-D Muster PHA-stimulierter, ³H-Leucin markierter Lymphozyten mit individuellen Variationen im pI oder MW.

spot	a - Variante		b - Variante		c - Variante	
	MW [kD]	pI	MW [kD]	pI	MW [kD]	pI
p 23	23	5.5	23	5.6	-	-
p 30	30	5.7	30	6.0	-	-
p 40	40	6.1	40	6.2	-	-
p 60	60	6.05	60	6.2	-	-
p 66	66	6.0	66	6.15	-	-
p 75	77	5.3	76	5.4	75	5.35

Alle 6 varianten Proteine konnten bei Durchführung der SDS-PAGE in 10 % Gelen beobachtet werden. In Gradientengelen (7.5 % - 20 %) waren dagegen nur die Proteine p 30, p 60 und p 66 eindeutig zu identifizieren und ihrem Phänotyp nach zu klassifizieren, während das p 75 zwar identifizierbar war, aber die Differenzierung der Phänotypen Schwierigkeiten bereitete.

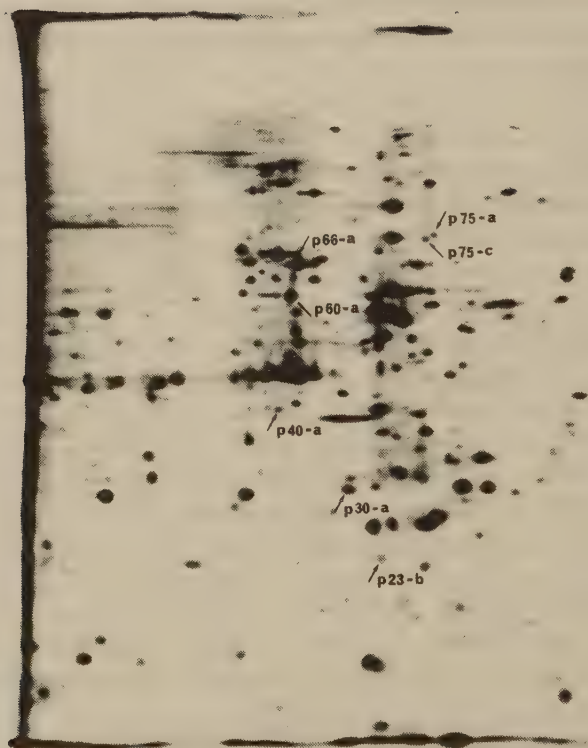


Abb.16. 2-D Fluorogramm (SDS-PAGE 10 %) PHA-stimulierter Lymphozyten zur Darstellung der Proteine mit individuellen Variationen im pI oder MW. Das Beispiel zeigt die relativ häufigen Phänotypen p 23 - b, p 30 - a, p 40 - a, p 60 - a, p 66 - a und p 75 - ac. Alle weiteren Phänotypen dieser 6 Proteine mit qualitativen individuellen Variationen sind in den Abb.19-39 unter Kap.3.8. gezeigt. Die MW und pI der 6 Proteine und ihrer Varianten sind in Tab.6 zusammengestellt.

3.6.3. Konstanz der 2-D Muster

Als Belege dafür, daß die beschriebenen qualitativen individuellen Unterschiede im 2-D Proteinmuster nicht durch Schwankungen der Kulturbedingungen oder bei der Zellpräparation verursacht wurden, sondern schon primär vorlagen, dienten folgende Kontrollversuche:

a) Bei einem Individuum wurden im Abstand von ca. 2 Monaten Kulturen von PHA-stimulierten Lymphozyten mit anschließender ^3H -Leucin-Markierung angelegt. Sowohl die Blutabnahme, als auch die Lymphozytenisolierung und -stimulierung, als auch die Markierung und schließlich die Zellpräparation erfolgten unabhängig voneinander. Die 2-D Proteinmuster waren in beiden Fällen in Bezug auf die qualitativen individuellen Variationen identisch, wobei sogar eine relativ seltene Variation bei dem Protein p 75 zu beobachten war. In Abb.17 sind die Fluorogramme dieser beiden Kulturansätze vergleichend dargestellt und die qualitativ varianten Proteine angezeigt. Weiterhin wurde von dieser Blutspenderin sogar eine dritte Kultur, allerdings ohne ^3H -Leucin Markierung, angelegt. Soweit die Proteine mit individuellen Variationen in silbergefärbten Gelen identifiziert werden konnten (alle außer p 23 und p 40), stimmten auch hier die beobachteten Phänotypen mit den Fluorogrammen überein.

b) Bei einem weiteren Individuum wurden zwar am selben Tag, aber dennoch unabhängig voneinander, zwei Parallelkulturen angelegt. Diese wurden sogar nach einem unterschiedlichen Protokoll markiert (unterschiedliche Zelldichte bzw. Mediummenge), und zeigten in 2-D Mustern wieder eine identische Ausprägung in den varianten Proteinen. Die beiden Fluorogramme sind in Abb.18 dargestellt.

c) Die Spender, bei denen parallel PHA- und PWM-Kulturen angelegt wurden, exprimierten unabhängig von dem gewählten Mitogen die selben Phänotypen bei den varianten Pro-

teinen. Hier sei auf die Abb.10 verwiesen, wo die PHA- und PWM-Muster eines Individuums vergleichend dargestellt sind (Kap.3.4.2.). Die varianten Proteine sind allerdings in dieser Abbildung nicht eingezeichnet, so daß eine Identifizierung für einen ungeübten Betrachter schwerfallen mag.

d) Soweit die varianten Proteine auf silbergefärbten Gelen identifizierbar waren, stimmten die Phänotypen bei Individuen, die parallel mit unstimulierten und PHA-stimulierten Kulturen untersucht wurden, ebenfalls überein (siehe Abb.8 und 9 unter Kap.3.4.1.).

Wie in Abb.17 und 18 zu erkennen ist, waren nicht nur die qualitativen Variationen im pI der Proteine p 23, p 30, p 40, p 60, p 66 und p 75 und in Protein 20 innerhalb eines Individuums reproduzierbar. Es konnte ebenso eine gute Übereinstimmung in der quantitativen Ausprägung der Proteinspots beobachtet werden (spot 17 und quantitative Ausprägung der nach Stimulierung ansteigenden Proteine).

Weiterhin traten auch bei unabhängig voneinander durchgeführter Zellkultivierung bei einem Individuum im MW-Bereich von 46 000 D (individuelle Variationen in Bezug auf An- oder Abwesenheit von Proteinen) die selben Proteinmuster auf.

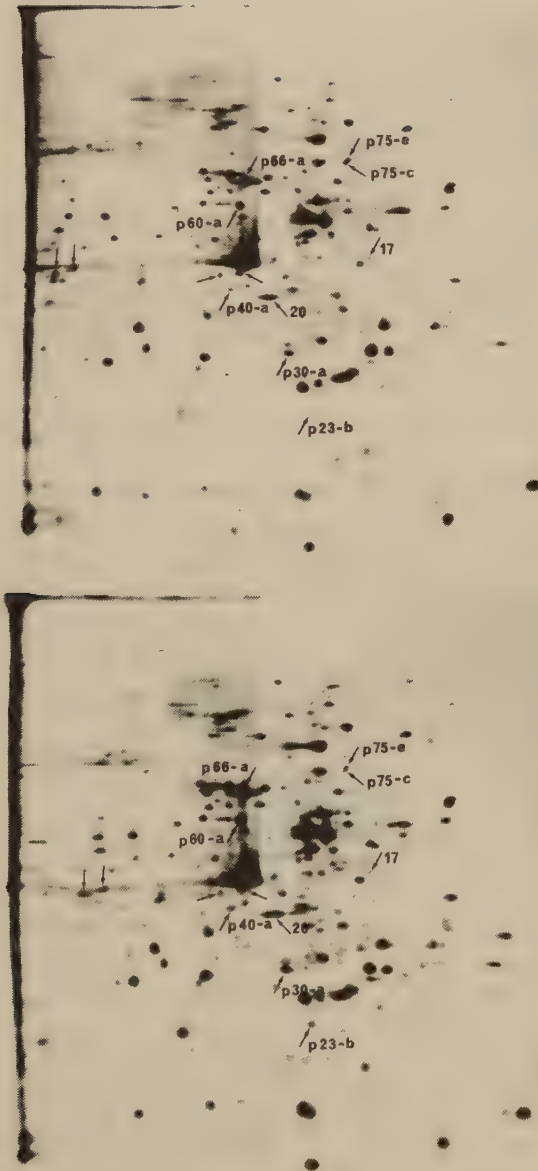


Abb.17. 2-D Fluorogramme der PHA-stimulierten Lymphozyten eines Individuums zur Veranschaulichung der individuellen Reproduzierbarkeit des Proteinmusters bei zeitlich unabhängig voneinander durchgeführter Blutabnahme und Zellkultivierung. Die varianten Proteine sind gekennzeichnet.

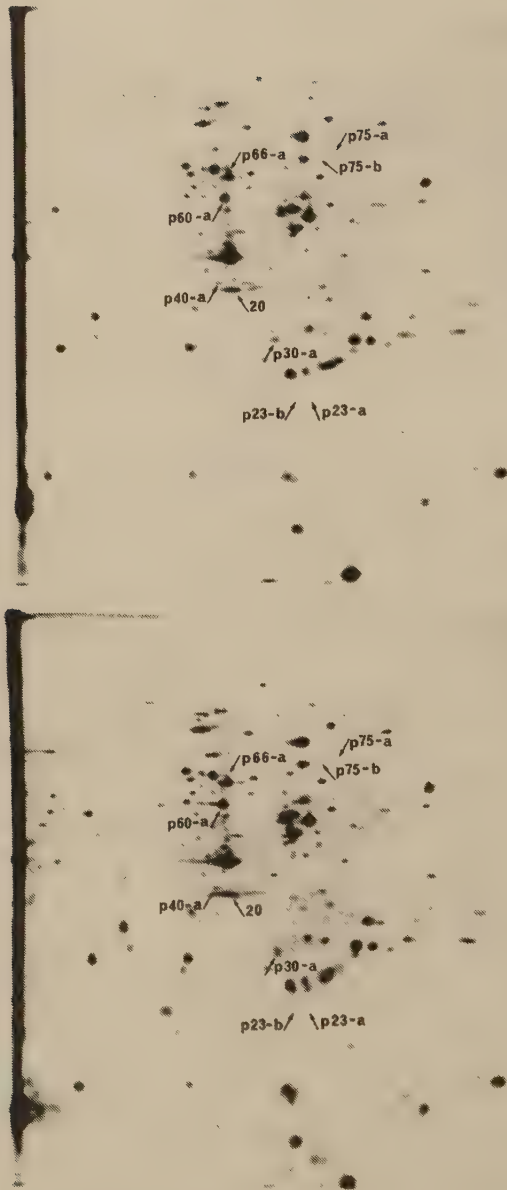


Abb.18. 2-D Fluorogramme der PHA-stimulierten Lymphozyten eines Individuums zu Veranschaulichung der Konstanz der Proteinhmuster bei unabhängig voneinander durchgeführter Zellkultivierung. Die varianten Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.7. Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede

3.7.1. Frage der geschlechtsspezifischen Unterschiede

Beim Vergleich der 2-D Proteinmuster von 20 männlichen und 26 weiblichen genetisch nicht-verwandten Spendern konnten keine reproduzierbaren geschlechtsspezifischen Unterschiede beobachtet werden.

3.7.2. Frage der altersspezifischen Unterschiede

Die Altersunterschiede der untersuchten Personen waren relativ groß. Deshalb wurde auch die Frage nach altersspezifischen Unterschieden im Proteinmuster untersucht. Die jüngsten Blutspender waren Kinder im Alter von 5 bis 9 Jahren und die ältesten Blutspender waren ca. 50 bis 60 Jahre alt. Beim Vergleich der 2-D Proteinmuster dieser zwei extremen Altersgruppen konnten jedoch keine reproduzierbaren altersspezifischen Unterschiede entdeckt werden.

3.8. Analyse genetischer Polymorphismen bei zellulären Proteinen menschlicher Lymphozyten

3.8.1. Familienuntersuchungen

Die beschriebenen qualitativen Unterschiede in Bezug auf IEF-Varianten im Proteinmuster (siehe Kap. 3.5.1.) können

- a) rein individuelle Variationen oder
- b) genetisch determinierte Variationen darstellen.

Die genetische Hypothese zu untersuchen lag nahe, da ein Proteinmuster, bei dem ein Individuum entweder nur eine IEF-Variante oder zwei IEF-Varianten nebeneinander exprimiert, einen Zustand von Homozygotie bzw. Heterozygotie vermuten läßt. Die genetische Fragestellung wurde durch Analyse der varianten Proteine in 12 Familien untersucht. Für jedes der 6 varianten Proteine wurde die Verteilung der Phänotypen in den Familien eruiert und anhand der Phänotypenverteilung bei Eltern und Kindern die genetische Hypothese überprüft.

Die Ergebnisse sind im Folgenden für jedes variante Protein in Form einer Tabelle und am Beispiel einiger Familien anhand von Ausschnitten aus 2-D Fluorogrammen in Abbildungen dargestellt.

a) Polymorphismus des p 23 Proteins

Tab.7. Phänotypenverteilung des p 23 in 12 Familien.

Eltern	Zahl der Familien	K i n d e r		
		p23-a	p23-ab	p23-b
a x a	-	-	-	-
a x ab	4	5	1	0
ab x ab	3	2	5	0
a x b	-	-	-	-
ab x b	4	0	5	3
b x b	1	0	0	3
Gesamt	12	7	11	6

Die Tab.7 zeigt die Phänotypenverteilung des p 23 in den 12 untersuchten Familien. Die drei beobachteten Phänotypen p 23 - a, p 23 - ab und p 23 - b kamen bei den Eltern der Familien in vier verschiedenen Kombinationen vor.

In vier Familien zeigten die Eltern die Phänotypen p 23 - a und p 23 - ab. Bei den Kindern waren ebenfalls nur diese beiden Phänotypen zu beobachten (siehe Abb.19).

In drei Familien besaßen beide Eltern den Phänotyp p 23 - ab und deren Kinder exprimierten entweder den Phänotyp p 23 - a oder den Phänotyp p 23 - ab (siehe Abb.20).

In weiteren vier Familien mit der Elternkombination p 23 - ab x p 23 - b wurden nur Kinder mit den Phänotypen p 23 - ab oder p 23 - b gefunden (siehe Abb.21).

In einer Familie, in der beide Eltern den Phänotyp p 23 - b aufwiesen, wurde bei den Kindern ausschließlich der selbe Phänotyp p 23 - b identifiziert (siehe Abb.22).

Diese Ergebnisse sprechen für eine einfache Vererbung der Proteinvarianten. Dabei verhalten sich die beiden IEF-Varianten wie allele Genprodukte, die phänotypisch in zwei homozygoten Formen (p 23 - a, p 23 - b) und einer heterozygoten Form (p 23 - ab) auftreten können. In keiner der Familien hat sich ein Widerspruch zu dieser genetischen Hypothese ergeben. Auffallend ist vielleicht die Überrepräsentation des Phänotyps p 23 - a bei den Kindern aus der Elternkombination p 23 - a x p 23 - ab, sowie das Fehlen des theoretisch möglichen Phänotyps p 23 - b bei den Kindern der Elternkombination p 23 - ab x p 23 - ab. Diese Abweichungen von der statistisch zu erwartenden Phänotypenverteilung bei den Kindern können auf der relativ kleinen Stichprobe beruhen.

In den Abb.19-22 sind die beobachteten Elternkombinationen jeweils am Beispiel einer Familie dargestellt.

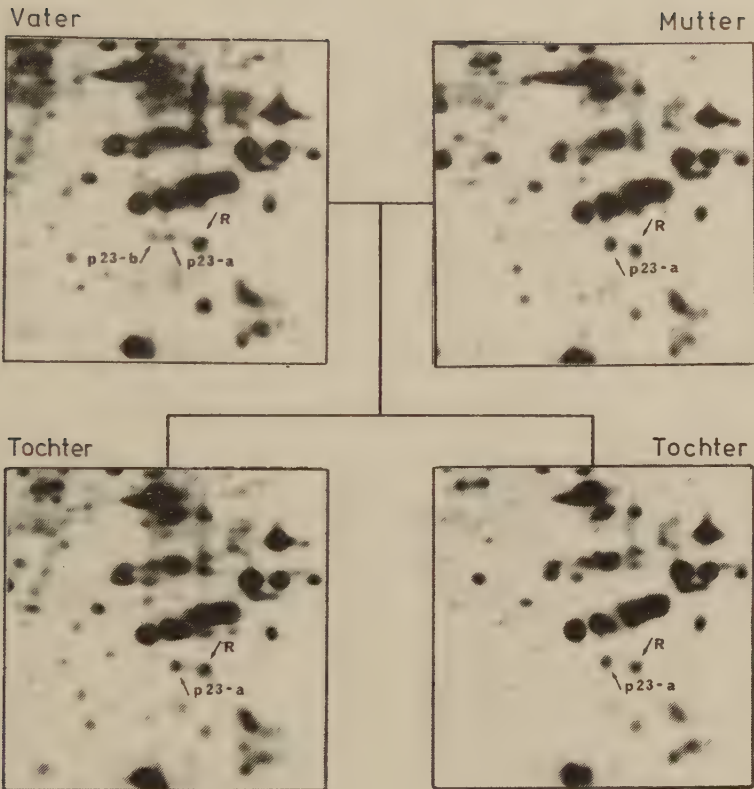


Abb.19. Phänotypen des p 23 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 23 - ab x p 23 - a. Beide Töchter zeigen den Phänotyp p 23 - a. Die beiden IEF-Varianten p 23 - a (MW 23 000 D, pI 5.5) und p 23 - b (MW 23 000 D, pI 5.6) sind gekennzeichnet. Im Vergleich zum Referenzspot R ist die quantitativ geringere Ausprägung der beiden IEF-Varianten beim heterozygoten Vater zu erkennen. Die Phänotypen sind anhand von Ausschnitten aus 2-D Fluorogrammen mit MW ca. 15 kD bis 45 kD und pH ca. 4.9 bis 6.2 dargestellt. Zur Orientierung im Gesamtfluorogramm siehe Abb.16.

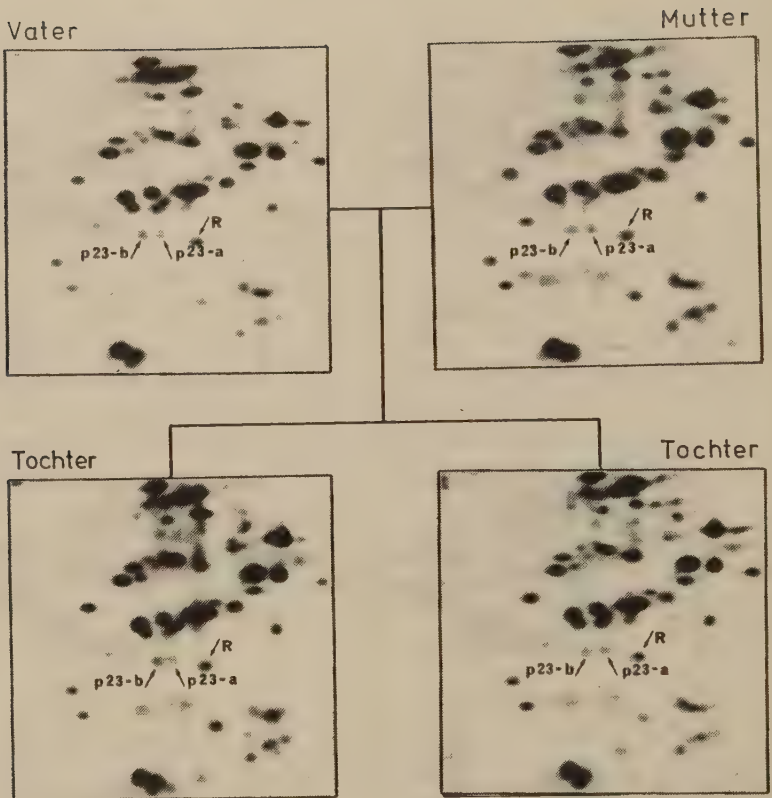
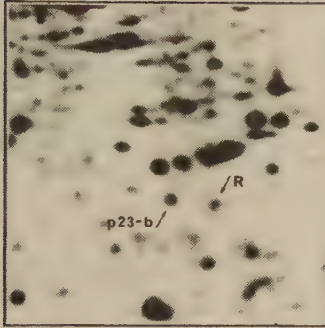
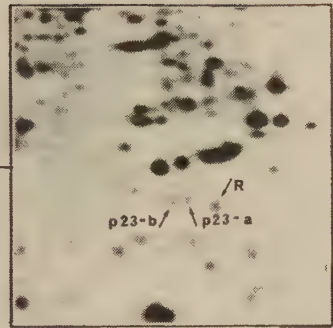


Abb.20. Phänotypen des p 23 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 23 - ab x p 23 - ab. Beide Töchter besitzen den Phänotyp p 23 - ab. Die IEF-Varianten p 23 - a (MW 23 000 D, pI 5.5) und p 23 - b (MW 23 000 D, pI 5.6) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.19.

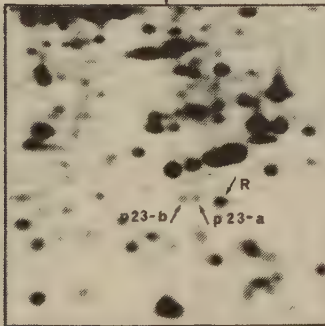
Vater



Mutter



Sohn



Tochter

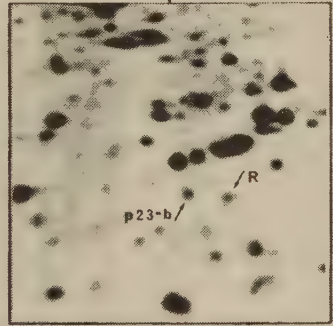


Abb.21. Phänotypen des p 23 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 23 - b x p 23 - ab. Der Sohn exprimiert den Phänotyp p 23 - ab, die Tochter den Phänotyp p 23 - b. Die IEF-Varianten p 23 - a (MW 23 000 D, pI 5.5) und p 23 - b (MW 23 000 D, pI 5.6) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die unterschiedliche quantitative Ausprägung der Proteinspots bei den homozygoten und heterozygoten Phänotypen wird im Vergleich zum Referenzspot R deutlich. Gezeigt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.19.

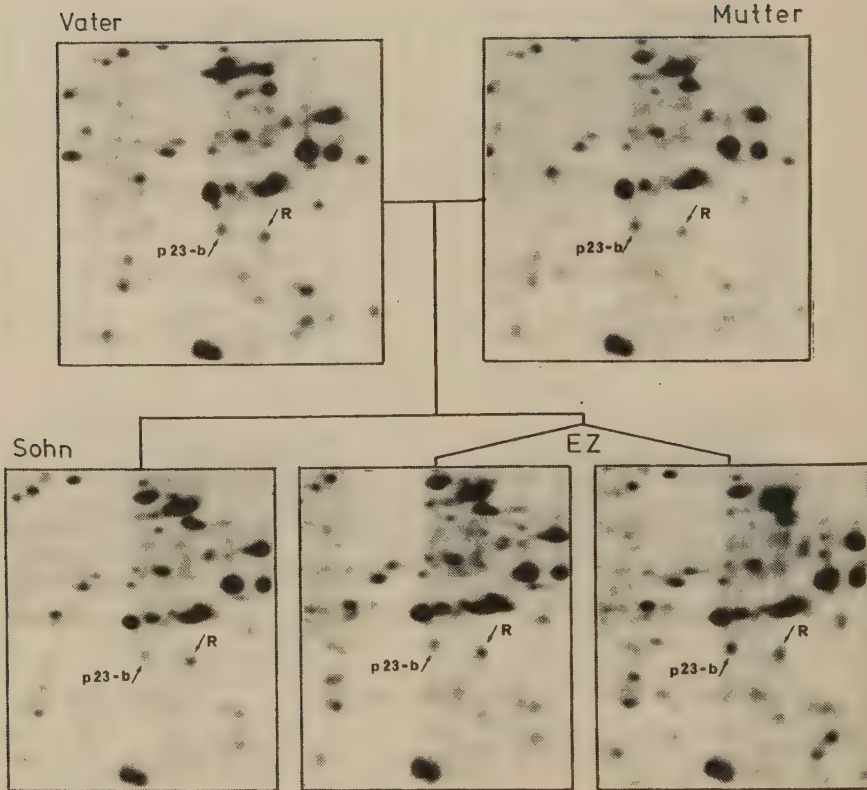


Abb.22. Phänotypen des p 23 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 23 - b x p 23 - b. Alle drei Kinder, der Sohn und das eineiige Zwillingsspaar, exprimieren den selben Phänotyp p 23 - b. Die IEF-Variante p 23 - b (MW 23 000 D, pI 5.6) ist gekennzeichnet. Bei den Eltern sind die Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.19 beschrieben, bei den Kindern etwas schmaler gewählt.

b) Polymorphismus des p 30 Proteins

Tab.8. Phänotypenverteilung des p 30 in 12 Familien.

Eltern	Zahl der Familien	K i n d e r		
		p30-a	p30-ab	p30-b
a x a	10	19	0	0
a x ab	2	3	2	0
Gesamt	12	22	2	0

In Tab.8 ist die Phänotypenverteilung des Proteins p 30 in den 12 untersuchten Familien zusammengestellt.

In 10 Familien war bei beiden Elternteilen und bei allen Kindern der häufige Phänotyp p 30 - a zu beobachten.

Nur zwei Familien zeigten die Elternkombination p 30 - a x p 30 - ab. Dabei traten bei den Kindern auch beide Phänotypen, p 30 - a und p 30 - ab, auf. In einer Familie besaßen der Vater und ein Sohn, in der anderen Familie die Mutter und eine Tochter den seltenen Phänotyp p 30 - ab.

In Abb.23 und 24 sind die beiden beobachteten Elternkombinationen am Beispiel je einer Familie dargestellt.

Die basische Variante dieses Proteins scheint sehr selten zu sein. Die Verteilung der Phänotypen innerhalb der Familien und vor allem die Weitergabe der seltenen Variante von einem Elternteil auf ein Kind sprechen für einen einfachen Vererbungsmodus. Die beiden IEF-Varianten p 30 - a und p 30 - b verhalten sich wie allele Genprodukte, die phänotypisch in einer homozygoten Form (p 30 - a) und einer seltenen heterozygoten Form (p 30 - ab) beobachtet wurden. Bei der Seltenheit des heterozygoten Phänotyps erstaunt das Fehlen des homozygoten p 30 - b Phänotyps nicht.

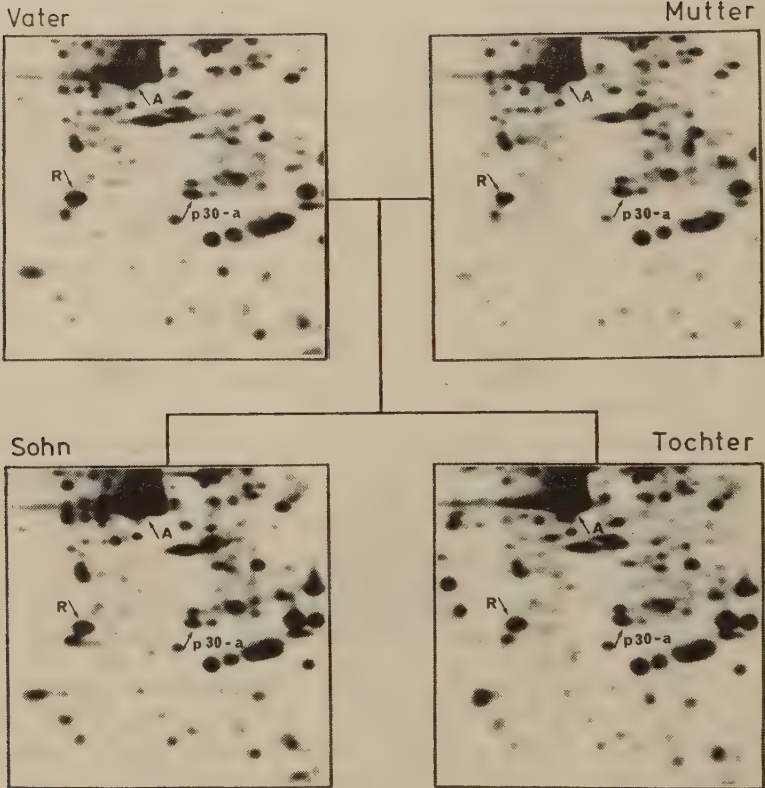


Abb.23. Phänotypen des p 30 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 30 - a x p 30 - a. Auch die beiden Kinder exprimieren ausschließlich die a-Variante des Proteins. Die Variante p 30 - a (MW 30 000 D, pI 5.7) ist gekennzeichnet. Als Referenzspots im 2-D Muster dienen A (Aktin) und R. Gezeigt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen mit MW ca.20 kD bis 50 kD und einem pH von ca. 5.0 bis 6.5.

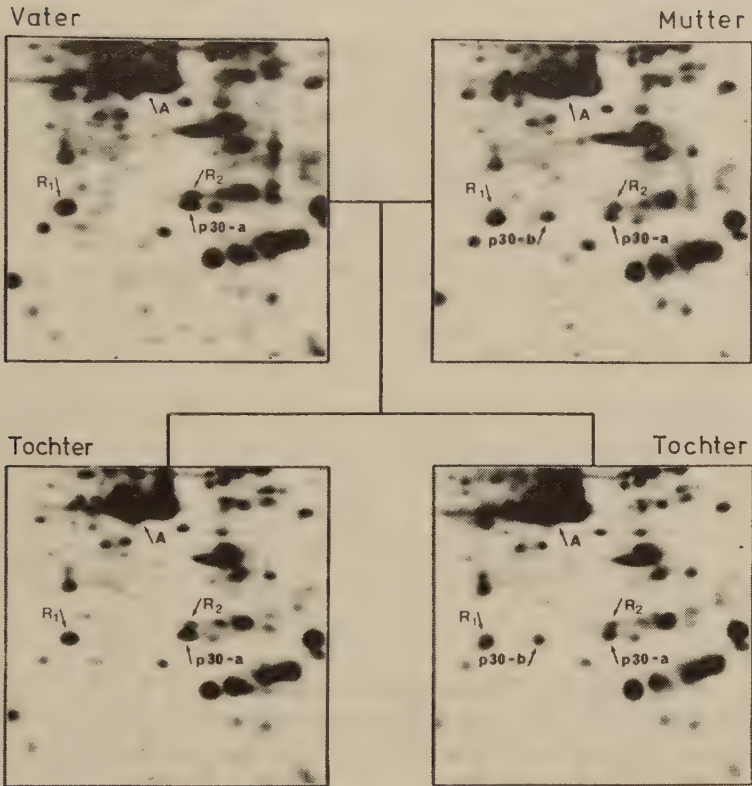


Abb.24. Phänotypen des p 30 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 30 - a x p 30 - ab. Eine Tochter besitzt den Phänotyp p 30 - a, die andere den Phänotyp p 30 - ab. Die IEF-Varianten p 30 - a (MW 30 000 D, pI 5.7) und p 30 - b (MW 30 000 D, pI 6.0) sind gekennzeichnet. Als Referenzspots zur Lage der Varianten dienen A und R₁. Im Vergleich zum Referenzspot R₂ können die quantitativen Unterschiede in der Ausprägung der p 30 - Varianten bei den homozygoten und den heterozygoten Personen erkannt werden. Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.23.

c) Polymorphismus des p 40 Proteins

Tab.9. Phänotypenverteilung des p 40 in 12 Familien.

Eltern	Zahl der Familien	K i n d e r		
		p40-a	p40-ab	p40-b
a x a	6	13	0	0
a x ab	5	4	4	0
ab x ab	-	-	-	-
a x b	1	0	3	0
ab x b	-	-	-	-
Gesamt	12	17	7	0

Tab.9 zeigt die Phänotypenverteilung des p 40 Proteins in 12 Familien. Die drei beobachteten Phänotypen p 40 - a, p 40 - ab und p 40 - b traten in drei verschiedenen Elternkombinationen auf.

In 6 Familien zeigten beide Elternteile und alle Kinder den Phänotyp p 40 - a (siehe Abb.25).

In 5 Familien war die Elternkombination p 40 - a x p 40 - ab zu beobachten. Hier spalteten sich die Kinder zu gleichen Teilen in die Phänotypen p 40 -a und p 40 - ab auf (siehe Abb.26).

Bei einer Familie mit der Elternkombination p 40 - a x p 40 - b exprimierten alle drei Kinder den Phänotyp p 40 - ab (siehe Abb.27).

Aus diesen Ergebnissen kann eindeutig eine genetische Weitergabe der a- bzw. b- Varianten des p 40 Proteins abge-

leitet werden. Die zwei Varianten verhalten sich wie zwei allele Genprodukte, die in zwei homozygoten Phänotypen ($p40 - a$ und $p40 - b$) und einem heterozygoten Phänotyp ($p40 - ab$) vorkommen. Die genetische Hypothese wird besonders unterstützt erstens durch die gleichmäßige Aufspaltung der Phänotypen in $p40 - a$ und $p40 - ab$ bei den Kindern aus der Elternkombination $p40 - a \times p40 - ab$, die genau der statistisch zu erwartenden Phänotypenverteilung entspricht, und zweitens durch das ausschließliche Auftreten des Phänotyps $p40 - ab$ bei den Kindern aus der Elternkombination $p40 - a \times p40 - b$.

Für jede der beobachteten Elternkombinationen ist in den Abb.25-27 je ein Beispiel dargestellt.

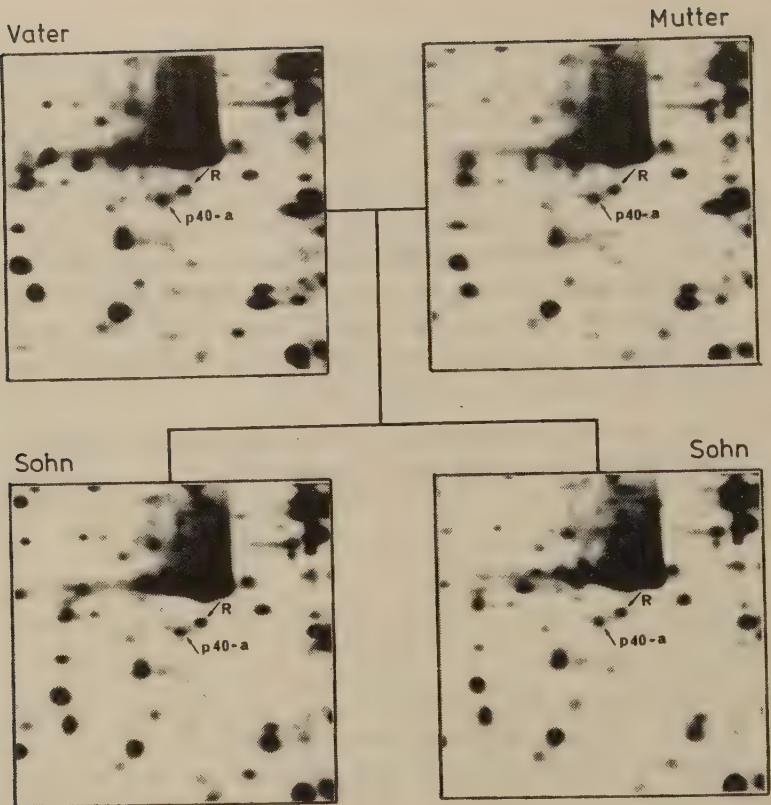


Abb.25. Phänotypen des p 40 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 40 - a x p 40 - a. Beide Kinder besitzen ebenfalls den Phänotyp p 40 - a. Die Variante p 40 - a (MW 40 000 D, pI 6.1) ist gekennzeichnet. Als Referenz dient spot R, der ungefähr die selbe Intensität wie das in homozygoter Form auftretende p 40 - a besitzt. Gezeigt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen mit MW ca. 25 kD bis 55 kD und einem pH von ca. 5.5 bis 6.7. A (Aktin) ist zur Orientierung im Gesamtproteinmuster angegeben.

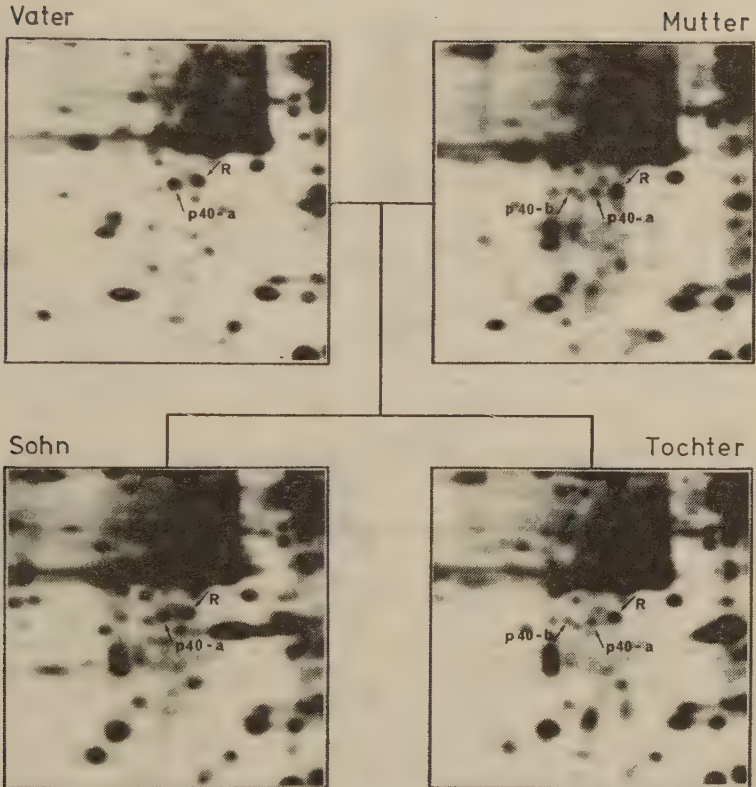


Abb.26. Phänotypen des p 40 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 40 - a x p 40 - ab. Der Sohn exprimiert den Phänotyp p 40 - a, die Tochter den Phänotyp p 40 - ab. Die IEF-Varianten p 40 - a (MW 40 000 D, pI 6.1) und p 40 - b (MW 40 000 D, pI 6.2) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. R dient als Referenzspot zur Verdeutlichung der quantitativen Unterschiede in der Ausprägung des p 40 beim homozygoten Phänotyp p 40 - a und beim heterozygoten Phänotyp p 40 - ab. Gezeigt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.25.

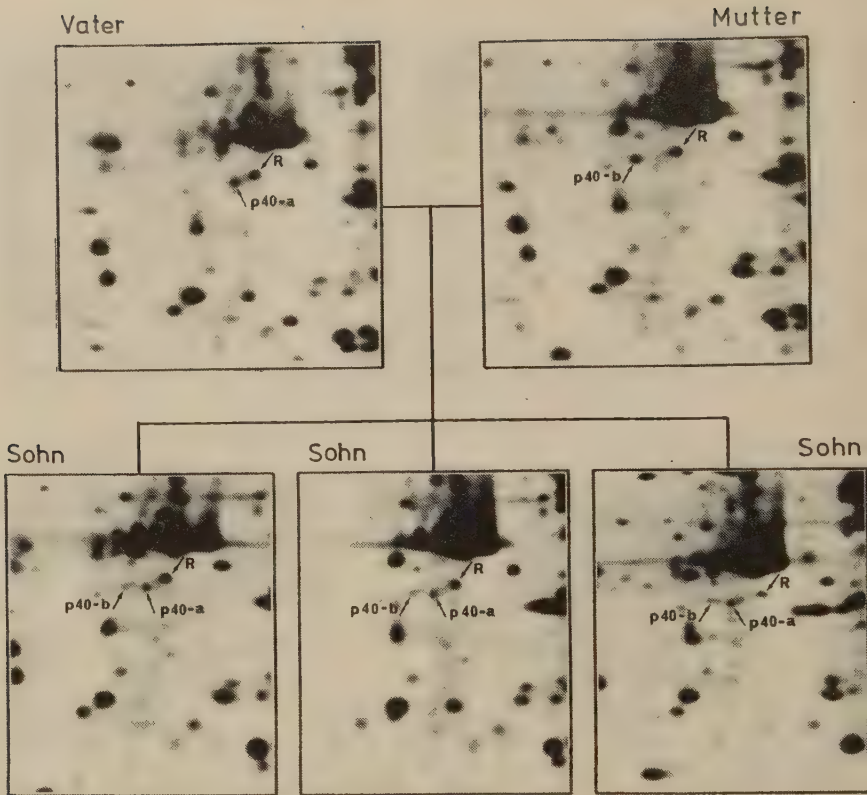


Abb.27. Phänotypen des p 40 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 40 - a x p 40 - b. Alle drei Söhne besitzen den Phänotyp p 40 - ab. Die IEF-Varianten p 40 - a (MW 40 000 D, pI 6.1) und p 40 - b (MW 40 000 D, pI 6.2) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Im Vergleich zum Referenzspot R zeigen die heterozygoten Kinder eine schwächere Ausprägung der beiden Varianten p 40 - a und p 40 - b als die homozygoten Eltern (weniger deutlich beim 3.Sohn). Die Ausschnitte aus den 2-D Fluorogrammen sind wie in Abb.25 gewählt, nur bei den Kindern etwas schmaler.

d) Polymorphismus des p 60 Proteins

Tab.10. Phänotypenverteilung des p 60 in 12 Familien

Eltern	Zahl der Familien	K i n d e r		
		p60-a	p60-ab	p60-b
a x a	11	22	0	0
a x ab	1	1	1	0
Gesamt	12	23	1	0

Die Tab.10 zeigt die Phänotypenverteilung des p 60 Proteins in 12 Familien.

Der häufige Phänotyp p 60 - a wurde bei beiden Elternteilen in 11 Familien beobachtet. Aus dieser Elternkombination resultierten ausschließlich Kinder mit dem selben Phänotyp p 60 - a (siehe Abb.28).

Der seltene Phänotyp p 60 - ab trat nur in einer Familie mit der Elternkombination p 60 - a x p 60 - ab auf. In dieser Familie konnte der Phänotyp p 60 - ab bei Vater und Tochter beobachtet werden. Mutter und Sohn dieser Familie besaßen den häufigen Phänotyp p 60 - a (Abb.29).

Die Weitergabe der seltenen b-Variante vom Vater auf die Tochter unterstützt die genetische Hypothese. Die beiden Varianten p 60 - a und p 60 - b verhalten sich wie allele Genprodukte, die in einer homozygoten und einer heterozygoten Form auftreten. Das seltene Vorkommen der b-Variante weist auf eine geringe Genfrequenz des p 60^b-Allels hin, was das Fehlen des zweiten homozygoten Phänotyps in dieser Untersuchung erklärt. Für eine genetische Basis dieser Variation spricht auch der beobachtete Gendosiseffekt

bei dem homozygoten und dem heterozygoten Phänotyp. Die deutlich verminderte quantitative Ausprägung der beiden Proteinvarianten beim heterozygoten Phänotyp verglichen mit der Spotstärke der a-Variante beim homozygoten Phänotyp hat auch zur Identifizierung des p 60 - b Proteins als Variante des p 60 - a Proteins beigetragen.

In den Abb. 28 - 30 sind Beispiele für die beobachteten Elternkombinationen des p 60 Proteins zusammen mit dem Polymorphismus des im nächsten Abschnitt beschriebenen p 66 Proteins dargestellt.

e) Polymorphismus des p 66 Proteins

Tab.11. Phänotypenverteilung des p 66 in 12 Familien

Eltern	Zahl der Familien	K i n d e r		
		p66-a	p66-ab	p66-b
a x a	5	10	0	0
a x ab	6	6	6	0
ab x ab	1	0	1	1
Gesamt	12	16	7	1

In Tab.11 ist die Phänotypenverteilung des p 66 Proteins in 12 Familien zusammengestellt. Bei den Eltern waren nur die beiden häufigeren Phänotypen p 66 - a und p 66 - ab in drei verschiedenen Kombinationen zu beobachten.

In 5 Familien mit der Elternkombination p 66 - a x p 66 - a fand man nur Kinder mit dem selben Phänotyp (Abb.28).

In 6 Familien besaß ein Elternteil den häufigen Phänotyp p 66 - a und der andere Elternteil den Phänotyp p 66 - ab. Hier spalteten sich die Phänotypen bei den Kindern zu gleichen Teilen in die Phänotypen p 66 - a und p 66 - ab auf (Abb.29).

Die Elternkombination p 66 ab x p 66 - ab trat nur bei einer Familie auf. Ein Sohn dieser Familie zeigte ebenso diesen Phänotyp p 66 - ab und der zweite Sohn exprimierte den seltenen Phänotyp p 66 - b (Abb.30).

Die Phänotypenverteilung innerhalb der Familien läßt auf eine einfache genetische Transmission der Proteinvarianten schließen. Die beiden IEF-Varianten p 66 - a und p 66 - b verhalten sich wie allele Genprodukte. Das ausschließliche

Auftreten des homozygoten Phänotyps p 66 - a bei den Kindern aus der Elternkombination p 66 - a x p 66 - a , sowie die der statistischen Erwartung entsprechende Aufspaltung der Kinder in die Phänotypen p 66 - a und p 66 - ab bei der Elternkombination p 66 - a x p 66 - ab und letztlich das Auftreten des seltenen Phänotyps p 66 - b bei einem Sohn von heterozygoten Eltern unterstützen die genetische Hypothese. Daneben ist eine Gendosisabhängigkeit in der quantitativen Ausprägung der Proteinspots zu beobachten.

In den Abb. 28 - 30 ist je ein Beispiel für jede Elternkombination dargestellt.

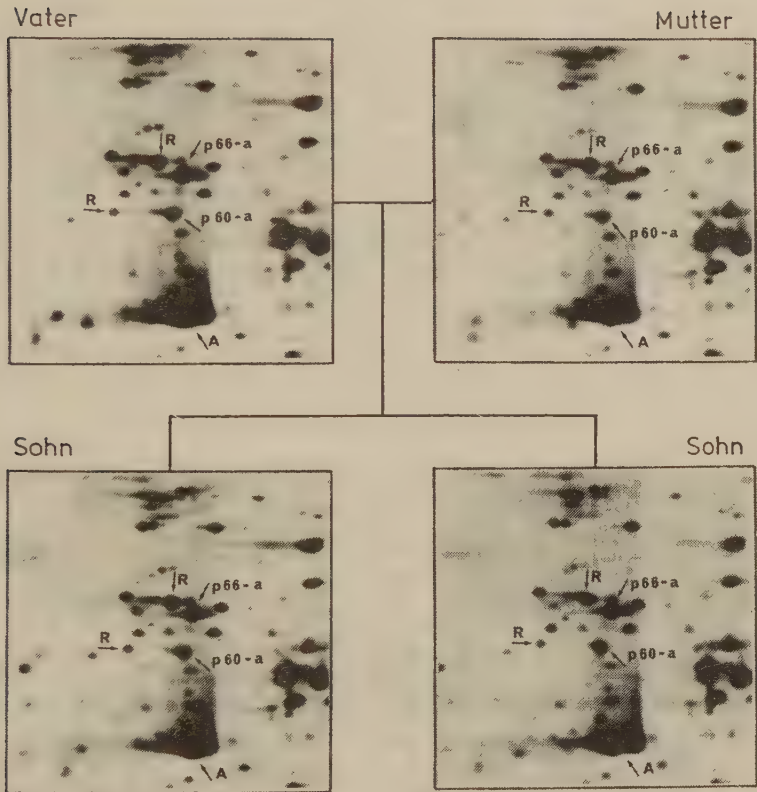


Abb.28. Phänotypen der polymorphen Proteine p 60 und p 66 in einer Familie mit der Elternkombination p 60 - a x p 60 - a bzw. p 66 - a x p 66 - a. Die Kinder zeigen für beide Proteine ebenso die homozygoten Phänotypen p 60 - a bzw. p 66 - a. Die IEF-Varianten p 60 - a (MW 60 000 D, pI 6.05) und p 66 - a (MW 66 000 D, pI 6.0) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Ausschnitte aus den 2-D Fluorogrammen mit MW ca. 40 kD bis 100 kD und einem pH von ca. 5.5 bis 6.7 sind gezeigt. Als Referenzspot zur Orientierung im Gesamtproteinmuster dient A (Aktin).

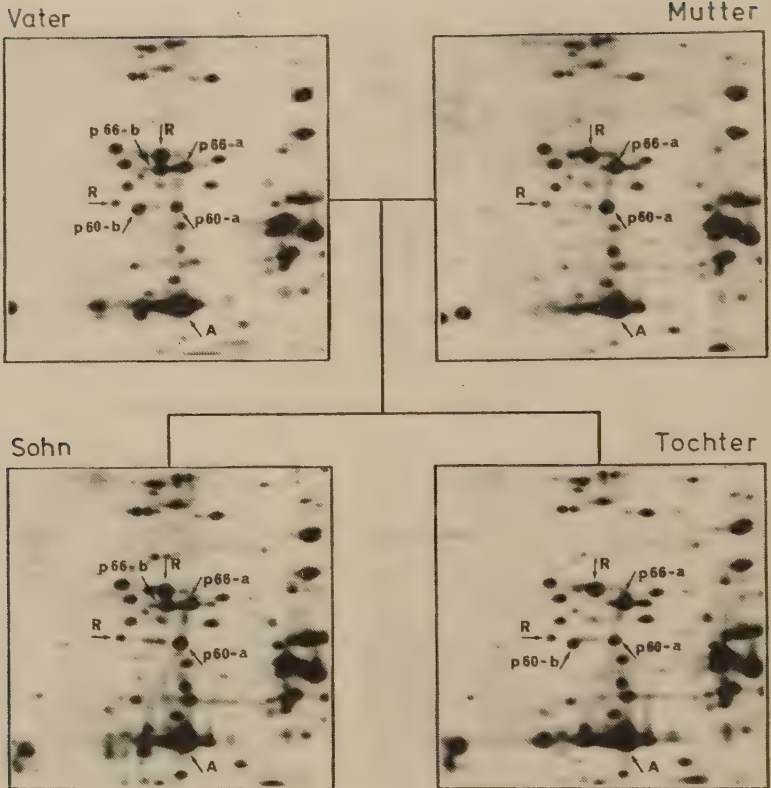


Abb.29. Phänotypen der varianten Proteine p 60 und p 66 in einer Familie mit der Elternkombination p 60 - a x p 60 - ab bzw. p 66 - a x p 66 - ab. Für beide polymorphen Proteine sind bei den Kindern beide Phänotypen ausgeprägt. Die Tochter besitzt die Phänotypen p 60 - ab und p 66 - a und der Sohn die Phänotypen p 60 - a und p 66 - ab. Die IEF-Varianten p 60 - a (MW 60 000 D, pI 6.05), p 60 - b (MW 60 000 D, pI 6.2), p 66 - a (MW 66 000 D, pI 6.0) und p 66 - b (MW 66 000 D, pI 6.15) sind gekennzeichnet. R dient als Referenzspot zur Lage der p 60 - b Variante. Gezeigt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.28.

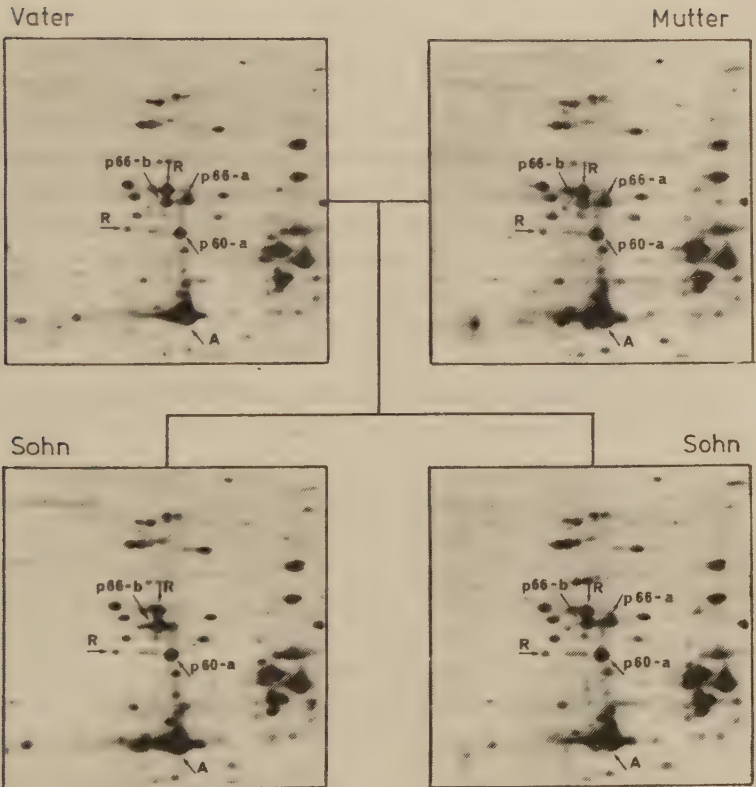


Abb.30. Phänotypen des p 66 in der Familie mit der Elternkombination p 66 - ab x p 66 - ab. Ein Sohn besitzt den sehr seltenen Phänotyp p 66 - b und der zweite Sohn wie die Eltern den Phänotyp p 66 - ab. Die IEF-Varianten p 66 - a (MW 66 000 D, pI 6.0) und p 66 - b (MW 66 000 D, pI 6.15) sind gekennzeichnet. R dient als Referenzprotein zur Lage und quantitativen Ausprägung der a- und b-Variante bei den verschiedenen Phänotypen. Für das ebenfalls eingezeichnete p 60 zeigen alle Familienmitglieder den selben häufigen Phänotyp p 60 - a (wie die Familie in Abb.28). Ausschnitte wie in Abb.28 beschrieben.

f) Polymorphismus des p 75 Proteins

Wie unter Kap.3.6.2. beschrieben sind bei dem p 75 Protein mindestens drei verschiedene Varianten zu unterscheiden. Gerade die Familienuntersuchungen haben ergeben, daß eventuell noch weitere IEF-Varianten postuliert werden müssen. In Tab.12 ist zunächst die Phänotypenverteilung des p 75 Proteins in den 12 untersuchten Familien unter der Annahme von 3 Allelen zusammengestellt.

Tab.12. Phänotypenverteilung des p 75 in 12 Familien unter der Annahme von 3 Allelen.

Eltern	Zahl der Familien	K i n d e r				
		p75-c	p75-ac	p75-a	p75-ab	p75-bc
c x c	1	2	0	0	0	0
c x ac	3	3	3	0	0	0
a x ac	1	0	1	1	0	0
a x ab	1	0	0	0	1	0
b x ab	1	0	0	0	2	0
ac x ab	2	0	1	0	2	1
ac x bc	1	0	1	0	0	1
ab x bc	2	0	2	0	1	2
Gesamt	12	5	8	1	6	4

Die unter Annahme von 3 Allelen beobachteten 6 verschiedenen Phänotypen (p 75 - a, p 75 - b, p 75 - c, p 75 - ab, p 75 - ac und p 75 - bc) traten in 8 verschiedenen Elternkombinationen auf.

Die Elternkombination $p75 - c \times p75 - c$ resultierte nur in Kindern mit dem selben Phänotyp $p75 - c$ (Abb.31). Kinder aus der Elternkombination $p75 - c \times p75 - ac$ exprimierten entweder den Phänotyp $p75 - c$ oder $p75 - ac$ (Abb.32). Be-saßen die Eltern die Phänotypen $p75 - a$ und $p75 - ac$, so wurden bei den Kindern ebenfalls diese beiden Phänotypen beobachtet (Abb.33). Zwei Söhne mit dem Phänotyp $p75 - ab$ resultierten aus der Elternkombination $p75 - ab \times p75 - b$ (Abb.34). Exprimierten die Eltern die heterozygoten Phäno-
typen $p75 - ac$ und $p75 - ab$, so konnten bei den Kindern auch diese zwei Phänotypen $p75 - ac$ und $p75 - ab$ identifi-
ziert werden (Abb.35).

Die bisher genannten Beispiele für 5 verschiedene Eltern-
kombinationen sind in den Abb.31 bis 35 dargestellt. In diesen Beispielen waren die Phänotypen $p75 - c$, $p75 - ac$, $p75 - a$, $p75 - ab$ und $p75 - b$ eindeutig aufgrund ihres leicht unterschiedlichen MW und ihrer Lage in Bezug auf die in den Abbildungen angegebenen Referenzproteine zu identifizieren. Die auftretenden Phänotypen paßten in das Schema von 3 IEF-Varianten bzw. 3 Allelen, die in 6 unter-schiedlichen Phänotypen auftreten können (3 homozygote und 3 heterozygote Phänotypen).

In einer Familie, in der die Mutter eindeutig den Phänotyp $p75 - ab$ exprimierte, mußte beim Vater eine weitere Varia-tion diskutiert werden (Abb.36). Nach dem 3-Allelen-Modell wäre der Vater als $p75 - bc$ Phänotyp zu bezeichnen, jedoch war neben einem offensichtlich als c-Variante zu identifi-zierenden Protein ein Proteinspot ausgeprägt, der einen basischeren pI als die b-Variante aufwies. Verglichen mit dem Phänotyp $p75 - bc$ bei den Söhnen wurde die unterschied-liche Lage des Proteinspots beim Vater offensichtlich. Eine neue Variante, die dem Alphabet chronologisch folgend als d-Variante bezeichnet wurde, konnte vermutet werden. Unter Annahme eines weiteren Allels wäre dem Vater der neue Phänotyp $p75 - cd$ zuzuordnen. Zwei Söhne dieser Fami-

lie exprimierten den Phänotyp p 75 - bc, der in den bisherigen Beispielen noch nicht beobachtet werden konnte, und der dritte Sohn den Phänotyp p 75 - ec. Aufgrund dieser Konstellation konnte eine Transmission der beim Vater postulierten neuen Variante in dieser Familie nicht nachgewiesen werden. Alle drei Söhne hatten vom Vater die c-Variante erhalten.

In einer weiteren Familie besaß die Mutter den Phänotyp p 75 - bc und beim Vater wurde ein Phänotyp beobachtet, der wiederum nicht eindeutig einem der bisher beschriebenen Phänotypen zugeordnet werden konnte. Der Vater exprimierte die c-Variante und eine etwas saurere Variante, die jedoch verglichen mit der a-Variante einen leicht basischeren pI besaß und somit extrem nahe an die c-Variante heranrückte (Abb.37). Die Tatsache, daß genau der selbe Phänotyp bei der Tochter dieser Familie beobachtet wurde, führte zur Postulierung einer neuen Variante, die dem Alphabet chronologisch folgend als e-Variante bezeichnet wurde. Der nach dem 3-Allelen-Modell als p 75 - ac einreistufende Phänotyp würde bei Annahme eines neuen Allels als p 75 - ce Phänotyp beschrieben werden. Vater und Tochter dieser Familie zeigten den neuen Phänotyp p 75 - ce, während die Mutter und der Sohn der Familie eindeutig den bc-Phänotyp aufwiesen.

Die neu zu diskutierenden d- und e-Varianten des p 75 konnten noch bei einer weiteren Familie beobachtet werden (Abb.38), in der die Mutter den Phänotyp p 75 - ec und der Vater den Phänotyp p 75 - de aufwies. Beide Kinder exprimierten die d-Variante des Vaters in den Phänotypen p 75 - cd bzw. p 75 - ad. Hier hat also offensichtlich eine genetische Transmission der d-Variante vom Vater auf die Kinder stattgefunden.

Als letztes Beispiel soll eine Familie vorgestellt werden (Abb.39), bei der eventuell noch eine weitere Variante diskutiert werden könnte. Der Vater besaß die a-Variante

und eine neue Variante, die eine etwas anodaliere Lage als die a-Variante einnahm. Auch bei den Kindern war eine auffallend anodale Position des sauren Proteinspots zu beobachten, so daß eventuell noch eine weitere f-Variante eingeführt werden sollte. Für den Vater ergab sich dann der Phänotyp p 75 - df, die Mutter exprimiert den Phänotyp p 75 - bc und die Kinder die Phänotypen p 75 - bf und p 75 - cf.

Unter der Annahme, daß die drei beobachteten Variationen im pI des p 75 Proteins auf drei weiteren Allelen (d, e, f) beruhen, wurde sich die in Tab. 13 zusammengestellte Phänotypenverteilung für die untersuchten Familien ergeben. Eine Familie war nicht eindeutig identifizierbar und wurde deshalb in dieser Tabelle nicht berücksichtigt.

Unabhängig davon, ob man von der Existenz von 3 Allelen ausgehend die Individuen den 6 möglichen Phänotypen zuordnet, oder ob man die Existenz von weiteren Allelen (insgesamt eventuell 6 Allele) annimmt und dementsprechend wesentlich mehr unterschiedliche Phänotypen in den Familien differenzieren kann, konnte die Phänotypenverteilung innerhalb der Familien durch genetische Weitergabe der Varianten erklärt werden. Es ergab sich trotz der vielen Kombinationsmöglichkeiten bei 3 bzw. 6 Allelen nie ein Widerspruch zur genetischen Hypothese.

Tab.13. Phänotypenverteilung des p75 Proteins in 11 Familien unter Annahme von 6 Allelen.

Eltern	Zahl der Familien	K i n d e r													
		a	b	c	ab	ac	bc	ce	be	ad	cd	cf	bf	de	df
c x c	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c x ac	2	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a x ac	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b x ab	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ab x ac	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c x ce	1	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
ce x bc	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
ac x de	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
cd x ab	1	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
bc x df	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
Gesamt	11	1	-	5	3	5	3	2	-	1	1	1	1	1	-

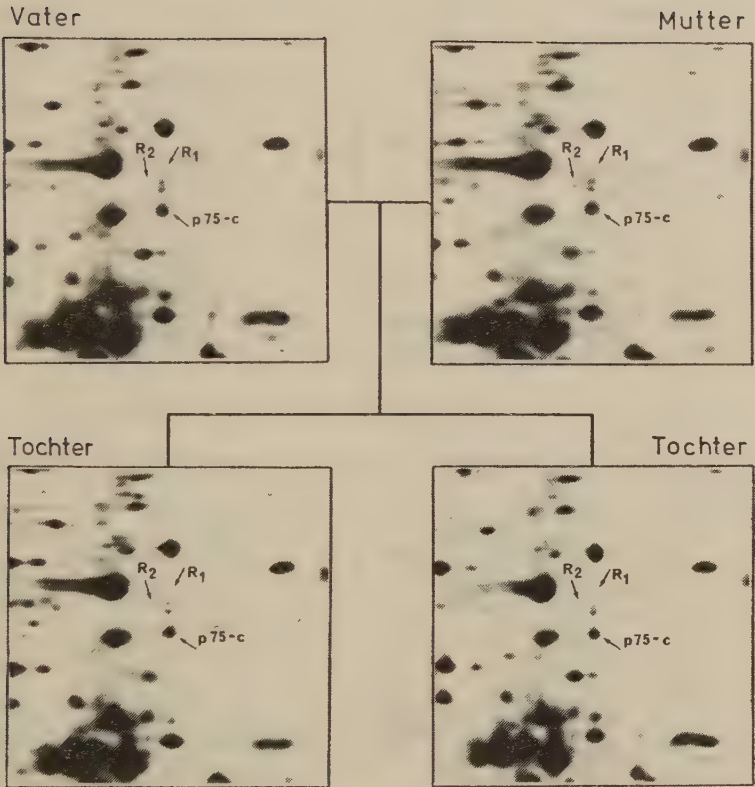


Abb.31. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - c x p 75 - c. Beide Töchter besitzen ebenfalls den Phänotyp p 75 - c. Die Variante p 75 - c (MW 75 000 D, pI 5.35) ist gekennzeichnet. R₁ und R₂ dienen als Referenzspots zur Identifizierung der c-Variante. Gezeigt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen mit MW ca. 50 kD bis 150 kD und einem pH von ca. 4.8 bis 5.8. Zur Orientierung im Gesamtproteinmuster siehe Abb.16.

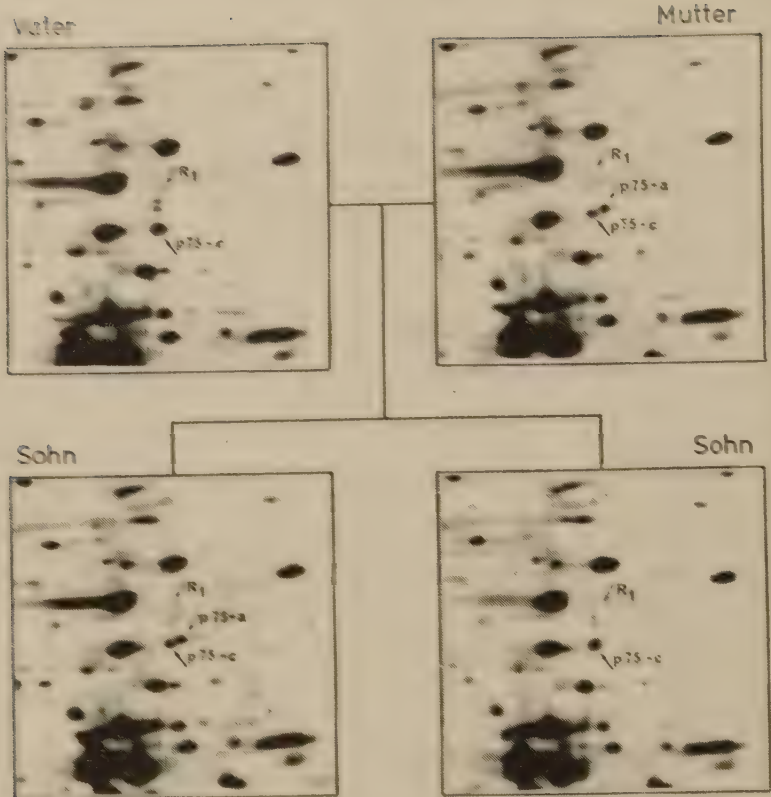


Abb.32. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - c x p 75 - ac. Die Söhne exprimieren wiederum die Phänotypen p 75 - c und p 75 - ac. Die Varianten p 75 - a (MW 77 000 D, pI 5.3) und p 75 - c (MW 75 000 D, pI 5.35) sind gekennzeichnet. Die Identifizierung der Varianten erfolgt aufgrund ihrer Lage in Bezug auf den Referenzspot R_1 und aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes. Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.31.

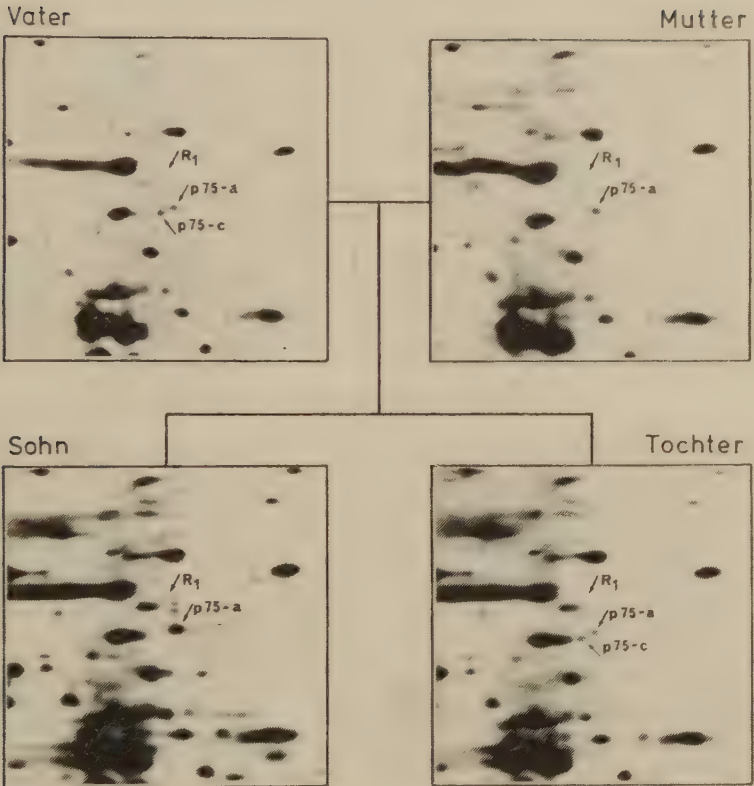


Abb.33. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - ac x p 75 - a. Bei den Kindern sind die selben Phänotypen p 75 - a und p 75 - ac zu beobachten. Die Proteinvarianten p 75 - a (MW 77 000 D, pI 5.3) und p 75 - c (MW 75 000 D, pI 5.35) sind gekennzeichnet. R₁ dient wiederum als Referenzspot zur Identifizierung der a- und c- Variante. Gewählt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.31.

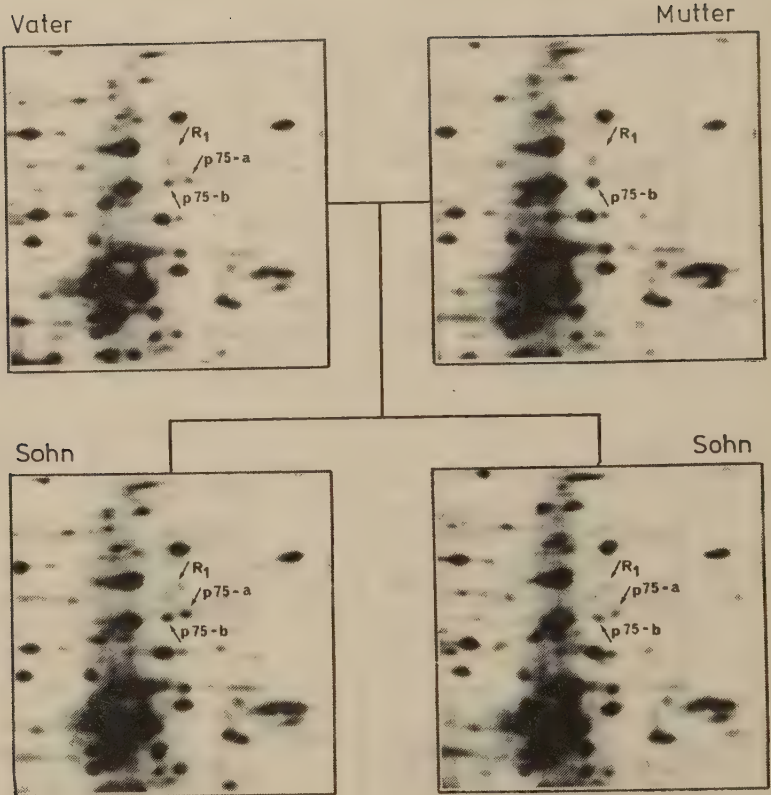
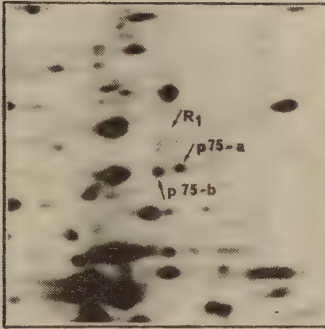
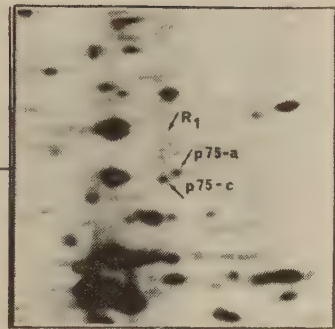


Abb. 34. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - ab x p 75 - b. Beide Kinder besitzen den Phänotyp p 75 - ab. Die Varianten p 75 - a (MW 77 000 D, pI 5.3) und p 75 - b (MW 76 000 D, pI 5.4) sind gekennzeichnet. R₁ dient als Referenzspot zur Identifizierung der Varianten, wobei die b-Variante verglichen mit der in Abb.31 vorgestellten c-Variante etwas weiter kathodal (links) liegt und ein geringfügig höheres MW aufweist. Die Differenzierung der b- und c-Variante wird in Abb.35 beim direkten Vergleich der p 75 - ac und - ab Phänotypen eventuell deutlicher. Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.31.

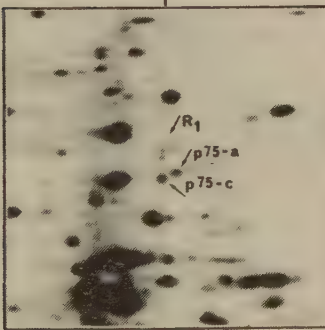
Vater



Mutter



Sohn



Tochter

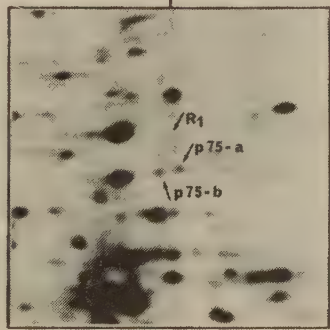


Abb.35. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - ab x p 75 - ac. Bei den Kindern sind ebenfalls die Phänotypen p 75 - ab und p 75 - ac zu beobachten. Die Varianten p 75 - a (MW 77 000 D, pI 5.3), p 75 - b (MW 76 000 D, pI 5.4) und p 75 - c (MW 75 000 D, pI 5.35) sind gekennzeichnet. Ihre unterschiedliche Lage in Bezug auf den Referenzspot R_1 ist eindeutig erkennbar. Gewählt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.31.

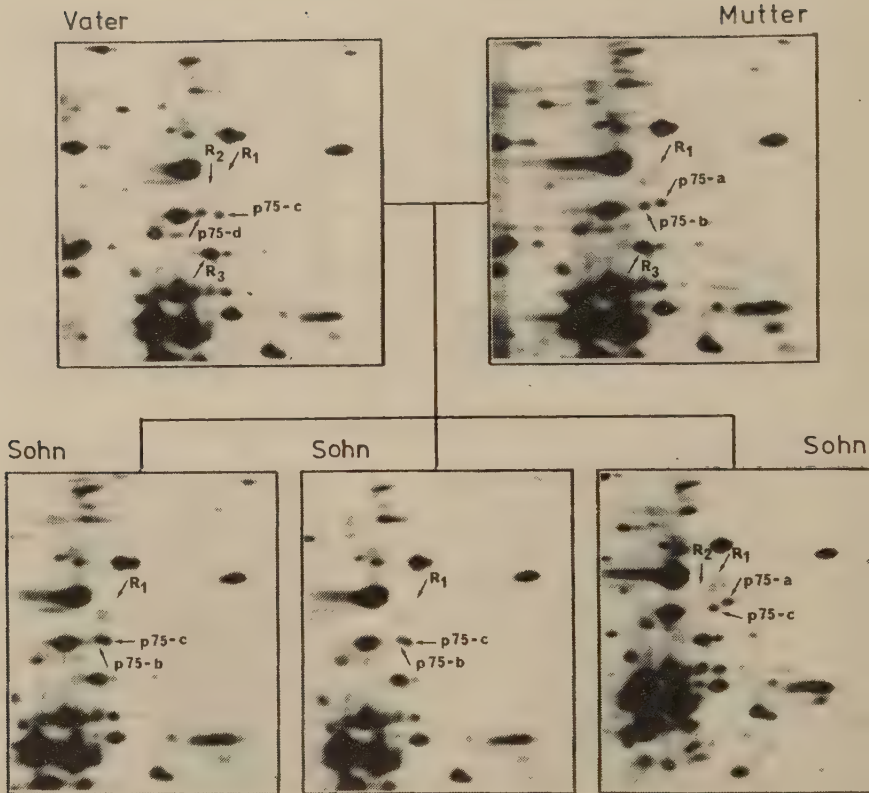


Abb.36. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - cd x p 75 - ab. Die Kinder exprimieren die Phänotypen p 75 - bc und p 75 - ac. Die Proteinvarianten p 75 - a, p 75 - b, p 75 - c (MW und pI dieser Varianten siehe Abb.35) und die als neue Variante zu diskutierende Variante p 75 - d (MW 76 000 D, pI 5.45) sind gekennzeichnet und in ihrer Lage in Bezug auf die Referenzspots R_1 , R_2 und R_3 identifizierbar. Der als neue d-Variante eingeführte Proteinspot ist durch seine Lage leicht kathodal von R_2 und R_3 charakterisiert. R_2 (pI = pI der b-Variante) ist nicht auf allen Fluorogrammen identifizierbar. Ausschnitte wie in Abb.31.

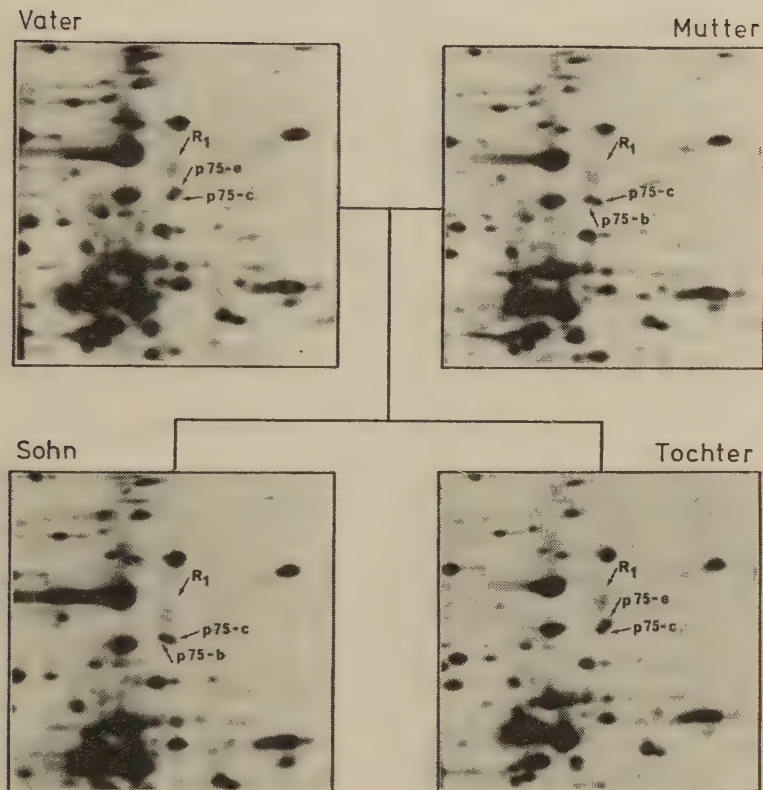


Abb.37. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 -ce x p 75 -bc. Auch bei den Kindern ist der Phänotyp p 75 -bc und der als neuer Phänotyp zu diskutierende Phänotyp p 75 -ce ausgeprägt. Die Varianten p 75 -b (MW 76 000 D, pI 5.4), p 75 -c (MW 75 000 D, pI 5.35) und p 75 -e (MW 77 000 D, pI zwischen 5.3 und 5.35) sind gekennzeichnet. Mit ihrem unterschiedlichen MW und ihrer unterschiedlichen Lage in Bezug auf den Referenzspot R_1 sind die Varianten eindeutig differenzierbar. Gezeigt sind Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.31.

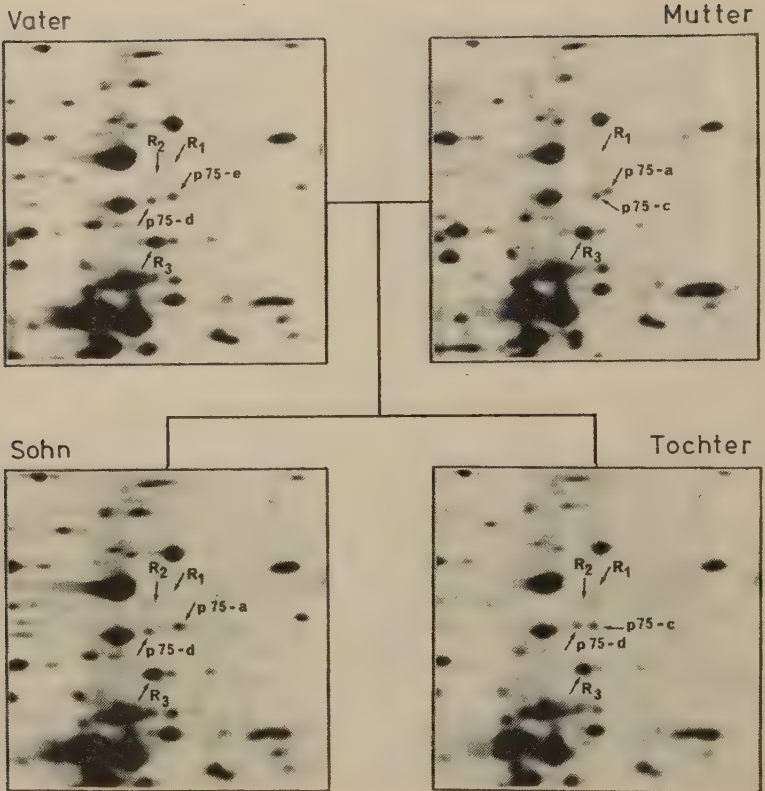


Abb.38. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - de x p 75 - ac. Bei den Kindern sind die Phänotypen p 75 - cd und p 75 - ad zu beobachten. Die Varianten p 75 - a (MW 77 000 D, pI 5.3), p 75 - c (MW 75 000 D, pI 5.35), p 75 - d (MW 76 000 D, pI 5.45) und p 75 - e (MW 77 000 D, pI 5.3-5.35) sind gekennzeichnet und aufgrund ihrer Lage in Bezug auf R₁, R₂ und R₃ identifizierbar. In dieser Familie wird die d-Variante vom Vater auf die Kinder weitergegeben, während diese von der Mutter die a- bzw. c-Variante erhielten. Ausschnitte aus 2-D Fluorogrammen wie in Abb.31.

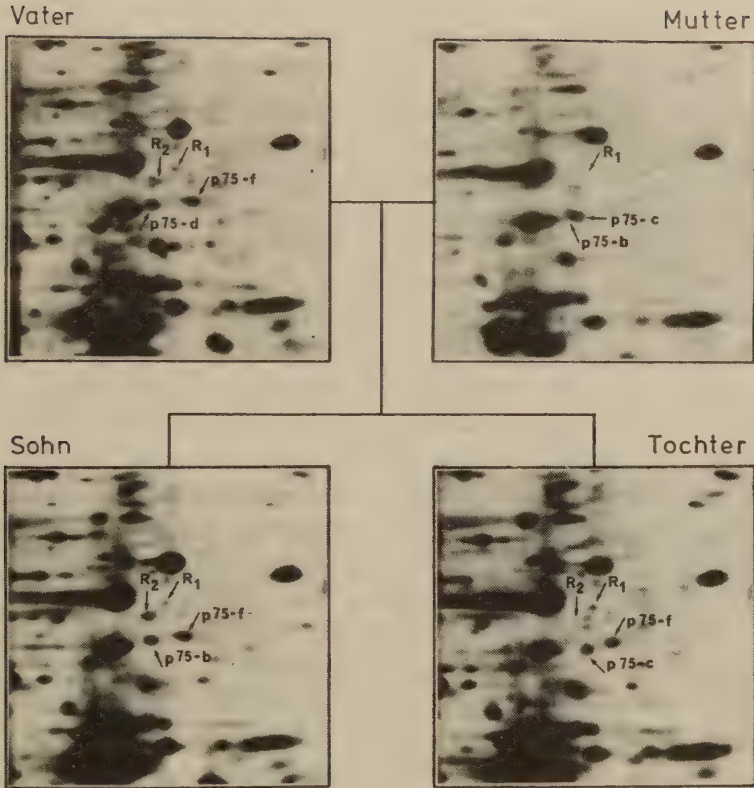


Abb.39. Phänotypen des p 75 Proteins in einer Familie mit der Elternkombination p 75 - df x p 75 - bc. Die Kinder exprimieren die Phänotypen p 75 - bf und p 75 - cf. Die Varianten p 75 - b (MW 76 000 D, pI 5.4), p 75 - c (MW 75 000 D, pI 5.35), p 75 - d (MW 76 000 D, pI 5.45) und eine eventuell neu einzuführende Variante p 75 - f (MW 77 000 D, pI 5.25) sind gekennzeichnet. Eine weitere Variante p 75 - f wurde hier angenommen, da sie verglichen mit der a-Variante weiter anodal (rechts) von spot R₁ liegt. Außerdem kommt in dieser Familie die unterschiedliche Lage der d-Variante in Bezug auf R₂ im Vergleich zur b- und c- Variante deutlich zum Ausdruck. Ausschnitte wie in Abb.31.

3.8.2. Monozygote Zwillinge

Neben den Familienuntersuchungen konnten auch die Analysen der 2-DE Muster eineiiger Zwillingspaare die genetische Grundlage der individuell varianten Proteine bestätigen. Die PHA-stimulierten Lymphozyten eines monozygoten Zwillingspaars und die EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien von zwei monozygoten Zwillingspaaren zeigten bei den Geschwistern eine identische Ausprägung in allen 6 polymorphen Proteinen.

In Abb.40 sind die 2-D Muster der PHA-stimulierten Lymphozyten des monozygoten Zwillingspaars und in Abb.41 ein Beispiel für die 2-D Muster eines Zwillingspaars anhand der lymphoblastoiden Zelllinien GOJ 1 und GOK 2 dargestellt.

Das monozygote Zwillingspaar, das mit PHA-stimulierten Lymphozyten untersucht wurde, exprimierte die Phänotypen p 23 - b, p 30 - a, p 40 - a, p 60 - a, p 66 - a und p 75 - c. Die lymphoblastoiden Zelllinien GOJ 1 und GOK 2 zeigten die Phänotypen p 23 - ab, p 30 - a, p 40 - a, p 60 - a, p 66 - a und p 75 - ab. Wegen der relativ kurzen Expositionszeit ist in Abb.41 der heterozygote Phänotyp p 23 - ab nur schwer zu erkennen. Bei dem dritten (nicht in einer Abbildung gezeigten) monozygoten Zwillingspaar, nämlich den Zelllinien HWL 2 und HWB 2, traten bei beiden Geschwistern die Phänotypen p 23 - ab, p 30 - a, p 40 - ab, p 60 - a, p 66 - a und p 75 - bd auf.

Nicht nur in den 6 polymorphen Proteinen stimmten die Zwillingspaare überein, sondern auch in den beschriebenen qualitativen Variationen in Bezug auf An- oder Abwesenheit von Proteinen im MW-Bereich von 45 000 D (Kap.3.6.2.a). Diese Proteine sind in den Abb.40 und 41 ebenfalls gekennzeichnet.

Weiterhin war eine überraschende Übereinstimmung in der quantitativen Ausprägung der Proteinspots zu verzeichnen. Neben den Proteinen, bei denen individuelle quantitative

Variationen in Abhängigkeit von der individuellen Stimulierbarkeit gefunden wurden (Kap.3.6.1.), war auch eine Übereinstimmung in der quantitativen Ausprägung des Proteins 17 (siehe 3.6.1.) zu erkennen. Dieses Protein war bei den aus PHA-stimulierten Lymphozyten untersuchten Zwillingen relativ gut markiert (Abb.40), während es bei dem gezeigten Beispiel der lymphoblastoiden Zelllinien GOJ 1 und GOK 2 kaum zu sehen war (Abb.41).

Weiterhin konnte eine sehr ähnliche Ausprägung des Protein 20, für das eine individuelle pI-Heterogenität beschrieben wurde (Kap.3.6.1.), bei den monozygoten Zwillingen festgestellt werden.

Insgesamt gesehen wiesen die 2-D Muster monozygoter Zwillingspaare eine überraschende Ähnlichkeit, um nicht zu sagen Identität auf. Höchstens Unterschiede, die auf der mangelnden Reproduzierbarkeit der IEF beruhen, konnten beobachtet werden. Die Übereinstimmung in den 2-D Mustern der Zwillinge entsprach zweifellos der Übereinstimmung der 2-D Muster bei multipler Analyse des Zelllysates eines Individuums.

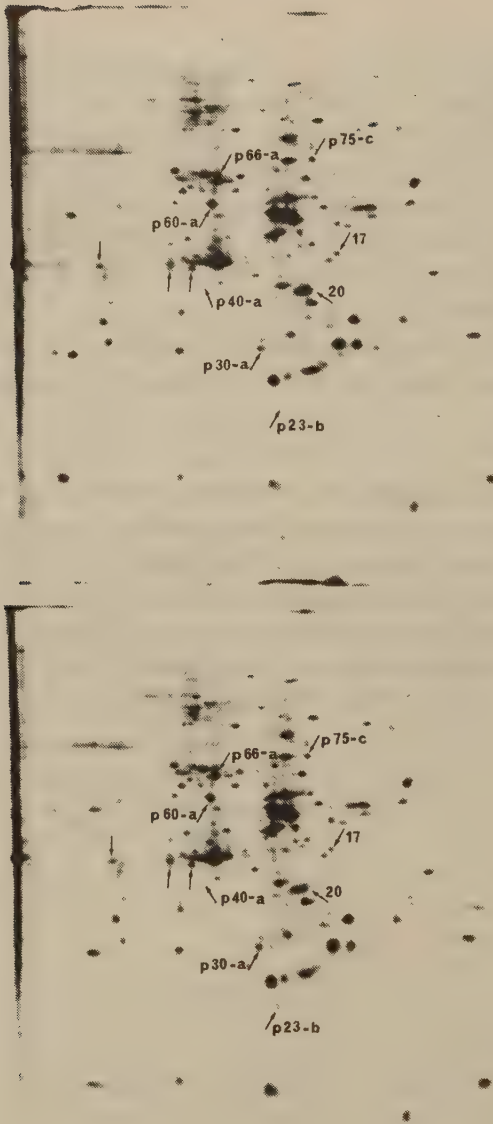


Abb.40. 2-D Fluorogramme PHA-stimulierter Lymphozyten eines monozygoten Zwillingspaares. Die Übereinstimmung in allen qualitativ variierenden Proteinen (Pfeile) und in der quantitativen Ausprägung der Proteine wird deutlich.

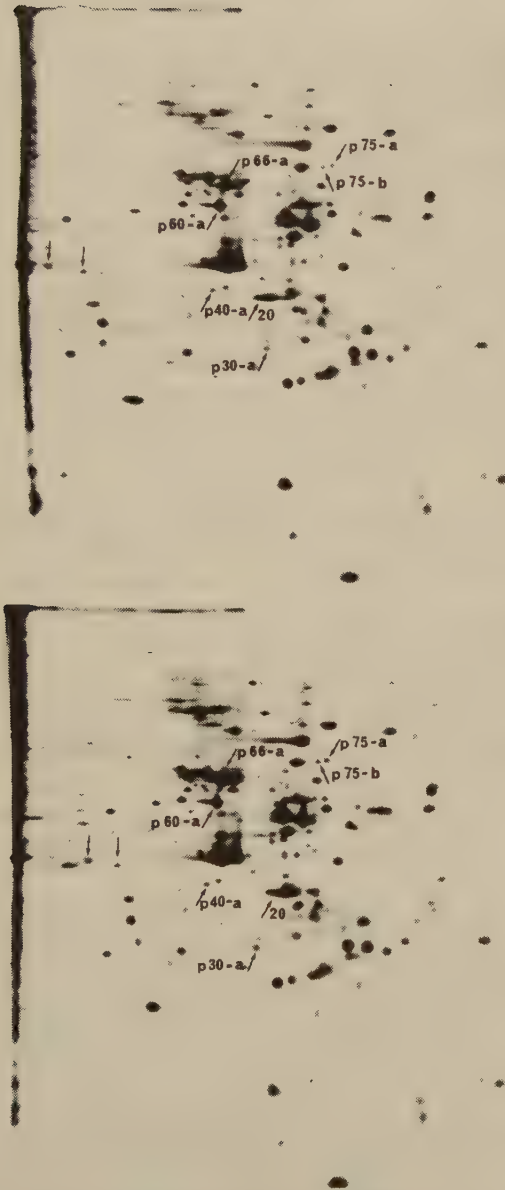


Abb.41. 2-D Fluorogramme EBV-transformierter Zelllinien eines monozygoten Zwillingspaares (GOJ 1/GOK 2). Die Übereinstimmung in der qualitativen (Pfeile) und quantitativen Ausprägung des Proteinmusters ist offensichtlich.

3.9. Populationsgenetische Untersuchungen

Die Familienuntersuchungen haben gezeigt, daß sich die Varianten der 6 Proteine p 23, p 30, p 40, p 60, p 66 und p 75 wie allele Genprodukte verhalten, die phänotypisch in homozygoten oder heterozygoten Formen auftreten können. In einer Stichprobe von 44 genetisch nicht-verwandten Individuen aus der süddeutschen Bevölkerung wurde die Phänotypenverteilung dieser polymorphen Proteine analysiert, um die Genfrequenzen der jeweiligen Allele zu bestimmen.

a) Phänotypen des p 23 Proteins in einer Stichprobe der süddeutschen Bevölkerung

Tab.14. Phänotypenverteilung des p 23 bei 44 genetisch nicht-verwandten Individuen

Phäno- typ	beobachtete Phänotypenverteilung		erwartete Phänotypenverteilung	
	n	%	n	%
p23-a	12	27.3	12.0	27.35
p23-ab	22	50.0	22.0	49.9
p23-b	10	22.7	10.0	22.75
Gesamt	44	100.0	44.0	100.0

Die Tab.14 zeigt die beobachtete Phänotypenverteilung des p 23 Proteins bei 44 genetisch nicht-verwandten Individuen. Alle drei Phänotypen waren in der Stichprobe zu beobachten, wobei der heterozygote Phänotyp annähernd doppelt so häufig

fig auftrat als die beiden homozygoten Phänotypen. Daraus errechneten sich die Genfrequenzen für die beiden Allele p_{23}^a und p_{23}^b zu 0.523 und 0.477. Wie aus der Tab.14 zu ersehen ist, stimmte die aus den Genfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg Gesetz berechnete Phänotypenverteilung exakt mit den beobachteten Ergebnissen überein.

b) Phänotypen des p 30 Proteins in einer Stichprobe der süddeutschen Population

Tab.15. Phänotypenverteilung des p 30 bei 44 genetisch nicht-verwandten Individuen.

Phäno- typ	beobachtete Phänotypenverteilung		erwartete Phänotypenverteilung	
	n	%	n	%
p30-a	42	95.5	42	95.4
p30-ab	2	4.5	2	4.6
p30-b	0	0	0	0
Gesamt	44	100	44	100

Aus der Tab.15 ist die beobachtete Phänotypenverteilung des p 30 Proteins abzulesen. Am häufigsten konnte der Phänotyp p 30 - a identifiziert werden, der heterozygote Phänotyp trat nur bei zwei Personen auf und der zweite homozygote Phänotyp p 30 - b wurde in der untersuchten Stichprobe nicht gefunden. Daraus ergaben sich für die Allele p_{30}^a und p_{30}^b Genfrequenzen von 0.977 und 0.023. Die nach dem Hardy-Weinberg Gesetz berechnete und die beobachtete Phänotypenverteilung stimmen überein.

c) Phänotypen des p 40 Proteins in einer Stichprobe der süddeutschen Population

Tab.16. Phänotypenverteilung des p 40 bei 42 genetisch nicht-verwandten Individuen

Phäno- typ	beobachtete Phänotypenverteilung		erwartete Phänotypenverteilung	
	n	%	n	%
p40-a	30	71.4	30	71.4
p40-ab	11	26.2	11	26.2
p40-b	1	2.4	1	2.4
Gesamt	42	100.0	42	100.0

Die beobachtete Phänotypenverteilung des p 40 Proteins wird aus der Tab.16 ersichtlich. Die meisten Individuen besaßen den homozygoten Phänotyp p 40 - a, ungefähr ein Viertel der Spender exprimierten den heterozygoten Phänotyp p 40 - ab und der zweite homozygote Phänotyp wurde nur bei einer Person beobachtet. Daraus lassen sich die Genfrequenzen für p 40^a zu 0.845 und für p 40^b zu 0.155 berechnen. Wiederum stimmte die nach dem Hardy-Weinberg Gesetz erwartete Phänotypenverteilung völlig mit der beobachteten Phänotypenverteilung überein.

In die Berechnungen gingen nur die Ergebnisse von 42 Spendern ein, weil bei 2 Personen, die nur mit unmarkierten Lymphozyten untersucht wurden, der Phänotyp nicht identifizierbar war. Das p 40 war in silbergefärbten Gelen meist nicht eindeutig identifizierbar.

d) Phänotypen des p 60 Proteins in einer Stichprobe der süddeutschen Population

Tab.17. Phänotypenverteilung des p 60 bei 44 genetisch nicht-verwandten Individuen

Phäno- typ	beobachtete Phänotypenverteilung		erwartete Phänotypenverteilung	
	n	%	n	%
p60-a	43	97.7	42.9	97.6
p60-ab	1	2.3	1.1	2.4
p60-b	0	0	0	0
Gesamt	44	100.0	44.0	100.0

Tab.17 zeigt die Phänotypenverteilung des p 60 Proteins bei 44 genetisch nicht-verwandten Individuen. Bis auf eine Person, die den heterozygoten Phänotyp p 30 - ab exprimierte, besaßen alle Individuen den homozygoten Phänotyp p 60 - a. Der zweite homozygote Phänotyp wurde nicht beobachtet. Daraus ließen sich die Genfrequenzen für p 60^a zu 0.988 und für p 60^b zu 0.012 berechnen. Die beobachtete und die erwartete Phänotypenverteilung stimmen gut überein. Aufgrund der niedrigen Genfrequenz des b-Allels waren innerhalb dieser Stichprobe der seltene heterozygote Phänotyp nicht öfter und der p 60 - b Phänotyp gar nicht zu erwarten gewesen.

e) Phänotypen des p 66 Proteins in einer Stichprobe der süddeutschen Population

Tab.18. Phänotypenverteilung des p 66 bei 44 genetisch nicht-verwandten Individuen.

Phäno- typ	beobachtete Phänotypenverteilung		erwartete Phänotypenverteilung	
	n	%	n	%
p66-a	34	77.3	33.7	76.6
p66-ab	9	20.4	9.6	21.9
p66-b	1	2.3	0.7	1.6
Gesamt	44	100.0	44.0	100.1

In Tab.18 sind die in der Stichprobe von 44 genetisch nicht-verwandten Individuen beobachteten Phänotypen für das p 66 Protein zusammengestellt. Der seltene homozygote Phänotyp p 66 - b, der bei den Familienuntersuchungen nur einmal bei dem Sohn einer Familie gefunden wurde, konnte auch bei dieser Stichprobe nur einmal identifiziert werden. Am häufigsten wurde der Phänotyp p 66 - a beobachtet (ca.77% der Spender) und der heterozygote Phänotyp trat bei ca.20% der nicht-verwandten Personen auf. Daraus ergaben sich für die Allele p 66^a und p 66^b Genfrequenzen von 0.875 und 0.125. Die beobachtete und die erwartete Phänotypenverteilung zeigten eine relativ gute Übereinstimmung.

f) Phänotypen des p 75 Proteins in einer Stichprobe der süddeutschen Bevölkerung

Für das p 75 Protein müssen zwei Möglichkeiten, nämlich das Auftreten in 3 oder in 6 verschiedenen Proteinvarianten, diskutiert werden. In Tab.19 ist zunächst die Phänotypenverteilung bei den genetisch nicht-verwandten Individuen unter der Annahme von 3 Allelen ($p 75^a$, $p 75^b$ und $p 75^c$) zusammengestellt.

Tab.19. Phänotypenverteilung des p 75 bei 43 genetisch nicht-verwandten Individuen unter Annahme von 3 Allelen.

Phäno- typ	beobachtete Phänotypenverteilung		erwartete Phänotypenverteilung	
	n	%	n	%
p75-a	3	7.0	3.7	8.5
p75-b	2	4.6	3.7	8.5
p75-c	8	18.6	7.5	17.5
p75-ab	10	23.3	7.3	16.9
p75-ac	9	20.9	10.4	24.3
p75-bc	11	25.6	10.4	24.3
Gesamt	43	100.0	43.0	100.0

Wie aus der Tab.19 zu erkennen, waren allgemein die heterozygoten Phänotypen häufiger zu beobachten als die homozygoten Phänotypen. Eine Ausnahme bildete der relativ häufige homozygote Phänotyp p 75 - c. Für die 3 Allele ergaben sich daraus Genfrequenzen von 0.291 für $p 75^a$, 0.291 für $p 75^b$ und 0.418 für $p 75^c$. Ein Vergleich der erwarteten und der beobachteten Phänotypenverteilung ließ nur teilweise eine

gute Übereinstimmung erkennen. Vor allem bei den Phänotypen p 75 - b und p 75 - ab waren relativ große Abweichungen der beobachteten von den errechneten Werten festzustellen.

In Tab.20 ist die Phänotypenverteilung unter Annahme von 6 Allelen zusammengestellt.

Tab.20. Phänotypenverteilung des p 75 bei 41 genetisch nicht-verwandten Individuen unter Annahme von 6 Allelen.

Phäno- typ	beobachtete Phänotypenverteilung		erwartete Phänotypenverteilung	
	n	%	n	%
p75-a	2	4.9	2.0	4.82
p75-b	2	4.9	2.0	4.82
p75-c	8	19.5	7.5	18.22
p75-ab	4	9.8	4.0	9.64
p75-ac	7	17.1	7.7	18.74
p75-bc	9	21.9	7.7	18.74
p75-ad	3	7.3	1.3	3.21
p75-cd	1	2.4	2.6	6.25
p75-ce	2	4.9	1.7	4.17
p75-be	1	2.4	0.9	2.14
p75-de	1	2.4	0.3	0.71
p75-df	1	2.4	0.1	0.18
Gesamt	41	99.9	37.8	91.64

In Tab.20 wurden nur 41 Individuen aufgenommen, da bei einigen Personen eine Identifizierung nicht eindeutig erschien. Aus der aufgeführten Phänotypenverteilung errechneten sich die Genfrequenzen der 6 Allele zu 0.220 für $p75^a$, zu 0.220 für $p75^b$, zu 0.427 für $p75^c$, zu 0.073 für $p75^d$, zu 0.049 für $p75^e$ und zu 0.012 für $p75^f$. Die erwartete und die beobachtete Phänotypenverteilung stimmen für einige Phänotypen ($p75 - a$, $- b$, $- ab$) genau und damit besser überein als unter der Annahme von 3 Allelen. Für $p75 - c$ verändern sich die Werte nicht, hier wurde auch bei dem 3-Allelen-Modell eine relativ gute Übereinstimmung der erwarteten und der beobachteten Phänotypenzahl gefunden. Weiterhin lag unter Annahme von 6 Allelen auch die Zahl an $p75 - ac$ Phänotypen näher an den erwarteten Ergebnissen. Während die durch das 6-Allelen-Konzept neu auftretenden Phänotypen $p75 - ce$ und $p75 - be$ in der erwarteten und beobachteten Häufigkeit gut übereinstimmen, waren die Phänotypen $p75 - ad$, $- de$ und $- df$ überrepräsentiert und der Phänotyp $p75 - cd$ unterrepräsentiert. Aber bei einem System aus 6 Allelen ist die Stichprobe wohl zu klein, um genaue Werte für die Phänotypenverteilung und die Genfrequenzen erzielen zu können.

In Tab.20 fällt vielleicht auf, daß die Summe der Häufigkeiten der verschiedenen Phänotypen nicht 100%, sondern nur ca.92% beträgt. Die Ursache liegt darin, daß die erwartete Phänotypenverteilung nur von den beobachteten Phänotypen berechnet wurde. Es fehlen also in der Tabelle einige Phänotypen, die nicht beobachtet wurden und denen wohl insgesamt eine erwartete Häufigkeit von 8% zukommt.

Zusammenfassend sind in der Tab.21 die Genfrequenzen für die Allele der Proteine $p23$, $p30$, $p40$, $p60$ und $p66$ (jeweils 2 Allele) aufgeführt. In Tab.22 sind die Genfrequenzen für das $p75$ Protein unter der Annahme von 3 Allelen und 6 Allelen vergleichend zusammengestellt.

Tab.21. Zusammenstellung der beobachteten Genfrequenzen für die 5 polymorphen Proteine p 23, p 30, p 40, p 60 und p 66.

Protein	A l l e l	
	a	b
p23	0.523	0.477
p30	0.977	0.023
p40	0.845	0.155
p60	0.988	0.012
p66	0.875	0.125

Tab.22. Genfrequenzen für das p 75 Protein unter Annahme von 3 bzw. 6 Allelen.

	3 Allele	6 Allele
p75 ^a	0.291	0.220
p75 ^b	0.291	0.220
p75 ^c	0.418	0.427
p75 ^d	-	0.073
p75 ^e	-	0.049
p75 ^f	-	0.012

3.10. Charakterisierung der zellulären Proteine

Die Proteine im 2-D Muster sind weitgehend nicht identifiziert. In diesem, die Darstellung der Ergebnisse abschließenden Kapitel, sollen die ersten Ansätze einer Charakterisierung der Proteine vorgestellt werden. Dabei muß vorausgeschickt werden, daß noch wesentlich intensivere Arbeit erforderlich wäre, um die Frage nach einer Charakterisierung der Proteine des 2-D Musters zufriedenstellend zu lösen. Dies ginge jedoch über das Ziel der vorliegenden Arbeit hinaus.

3.10.1. Identifizierung von cytosolischen Proteinen

Durch den Vergleich der Proteinmuster verschiedener Zellpräparationen sollte eine annähernde Charakterisierung in Bezug auf die Zuordnung der Proteine zu verschiedenen Zellfraktionen versucht werden (siehe Abb.42).

Die 2-D Muster cytosolischer Proteine verglichen mit Gesamtzellysaten zeigten auffallende Unterschiede. Es sollen hier nur Abweichungen in den Proteinen, die im Laufe der Arbeit im Zusammenhang mit Stimulierungsvorgängen oder individuellen Variationen beschrieben wurden, vorgestellt werden.

a) Erstens wurde die quantitative Ausprägung der 6 polymorphen Proteine (p 23, p 30, p 40, p 60, p 66 und p 75) im Zellysyt und in der Cytosolfraktion verglichen.

Das p 66 Protein war in der cytosolischen Fraktion ebenso stark oder stärker ausgeprägt als im Gesamtzellysyt, was eindeutig für eine Zuordnung des p 66 zum Cytosol der Zelle spricht.

Die Proteine p 23, p 30 und p 40 konnten in der Cytosolfraktion entweder in der gleichen Intensität oder in nur

leicht reduzierter Ausprägung wiedergefunden werden. Auch dies läßt darauf schließen, daß es sich eher um cytosolische Proteine handelt.

Das Protein p 60 trat zwar in der Cytosolpräparation auf, doch schien es im Vergleich zum Zellysat deutlich reduziert zu sein. Dies spricht dafür, daß das p 60 nicht ausschließlich im Cytosol vorkommt, sondern daß es in der Zelle weiter verbreitet ist.

Das Protein p 75 war dagegen im Cytosol verglichen mit dem Zellysat drastisch reduziert oder gar nicht identifizierbar, was eine Zuordnung zur Cytosolfraktion eindeutig ausschließt.

Erwähnenswert scheint noch zu sein, daß die im Cytosol identifizierten polymorphen Proteine immer den selben Phänotyp wie im Zellysat aufwiesen.

b) Zweitens wurden die Proteine im Molekulargewichtsbereich um 45 000 D, für die qualitative Variationen in Bezug auf An- oder Abwesenheit beschrieben wurden, im Cytosol in der gleichen Intensität und der gleichen qualitativen Ausprägung wie im Zellysat beobachtet. So sind diese Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit dem Cytosol der Zelle zuzuordnen.

Das Protein 20, bei dem eine individuelle pI-Heterogenität beobachtet wurde, konnte im Cytosol im allgemeinen nicht identifiziert werden.

c) Drittens war das Protein 17 (quantitative individuelle Variation) auffallend unterschiedlich ausgeprägt. Das Protein 17, das bei den meisten Individuen im Zellysat als sehr schwach markiertes Protein erschien und nur bei einigen Personen annähernd in der gleichen Intensität wie das darunterliegende Protein 18 auftrat, konnte in der Cytosolfraktion als deutlich markierter spot wiedergefunden werden. Umgekehrt war der spot 18 im Cytosol stark reduziert (siehe unten).

d) Viertens wurde die Verteilung der Proteine, die im Zusammenhang mit Stimulierungsvorgängen quantitative Veränderungen aufwiesen, in der Zelle untersucht.

Von den nach Stimulierung verstärkt synthetisierten Proteinen zeigten nur der spot 10 und der spot 12 die gleiche Intensität in beiden Fraktionen und können deshalb eindeutig als cytosolische Proteine definiert werden.

Die Proteine 8, 21, p 30, 25, 32 und 33 konnten in den cytosolischen Fraktionen teils in der gleichen und teils in leicht reduzierter Ausprägung beobachtet werden. Somit handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um cytosolische Proteine.

Die Proteine 1, 6, p 60, 34 und 36 waren in der cytosolischen Präparation offensichtlich weniger intensiv ausgeprägt, so daß sie nicht eindeutig als cytosolische Proteine bezeichnet werden können. Es scheint sich um Proteine mit einer breiteren zellulären Verteilung zu handeln.

Bei den Proteinen 3, 4, 7, 18 und 35 wurde eine drastische Reduktion in der Cytosolfraktion beobachtet. Diese Proteine kommen deshalb kaum als Kandidaten für cytosolische Proteine in Betracht. Das im Zellysat als stark markierter spot auftretende Protein 3 scheint aus mehreren Komponenten zu bestehen. In der cytosolischen Präparation waren hier zwei schwach markierte Proteinspots zu differenzieren.

Das Protein 11, dessen auffallend stärkere Markierung nach PHA-Stimulierung beschrieben wurde, fehlt im Cytosol völlig. Ebenso konnte das Protein 39 im Cytosol kaum identifiziert werden.

Bei der Gruppe von Proteinen um 55 000 D (spot 14, 15 und 16) trat nicht nur ein quantitativer, sondern auch ein qualitativer Unterschied auf. Die Proteine 14 und 15 lagen im Cytosol nicht wie beim Zellysat direkt neben dem Protein 16, sondern sie besaßen einen wesentlich basischeren pI. Diese beiden Proteine waren in der cytosolischen Frak-

tion meist in quantitativ reduzierter Ausprägung im pH-Bereich des Aktin zu finden. Das Protein 16 behielt seine ursprüngliche Lage bei, wobei ebenfalls eine leichte quantitative Reduzierung festzustellen war.

In Abb.42 sind die verschiedenen Zellpräparationen vergleichend dargestellt.

3.10.2. Darstellung der Triton X-100 extrahierbaren Proteine

Die vergleichende Analyse der Triton X-100 Extrakte und der cytosolischen oder Zellysat-Präparationen ergab teilweise unerwartete Ergebnisse. Die Ähnlichkeit der 2-D Muster der cytosolischen Fraktion und der Triton-Extrakte waren erstaunlich groß. Im Idealfall sollten die Triton X-100 Extrakte vor allem Plasmamembranproteine enthalten.

Nur wenige Proteine konnten beobachtet werden, die eine ähnlich starke Ausprägung wie im Gesamtzellysat und eine im Vergleich zur Cytosolfraktion deutlich erhöhte Intensität aufwiesen, was für Membranproteine zu fordern wäre. Dies traf für die Proteine 1, 39 und p 60 zu, die demnach am ehesten Membranproteine darstellen.

Ebenso wie im Cytosol waren auch bei den Triton-Extrakten innerhalb des spot 3 zwei verschiedene Komponenten zu differenzieren, wobei die quantitative Ausprägung sich bei den Triton-Extrakten genau umgekehrt verhielt wie bei der Cytosolfraktion (siehe Abb.42).

Viele Proteine, die auf Grund des Vergleichs von Zellysat und Cytosol als cytosolische Proteine eingestuft wurden, erschienen auch in den Triton X-100 Extrakten. Dies deutet darauf hin, daß die Extraktionsbedingungen nicht restringierend genug waren, so daß eine Zellyse und damit eine Verunreinigung dieser Fraktion mit cytosolischen Proteinen stattfinden konnte.

Andere Proteine, die auf Grund ihres Fehlens oder ihrer starken Reduktion in der cytosolischen Fraktion als Kandidaten für Plasmamembranproteine favourisiert waren, konnten auch in den Triton-Extrakten nicht nachgewiesen werden (außer spot 1 und p 60, wie oben beschrieben).

Die Triton X-100 extrahierbaren Proteine sind in Abb.42 zusammen mit den Gesamtzelllysaten und den cytosolischen Proteinen dargestellt.

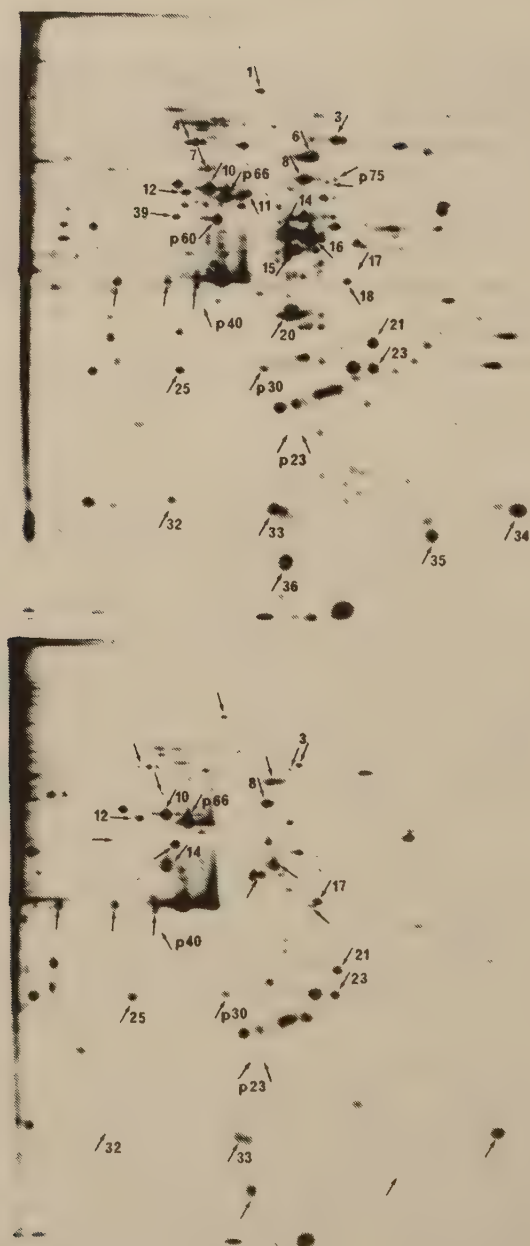


Abb.42. A) und B) Legende siehe nächste Seite.

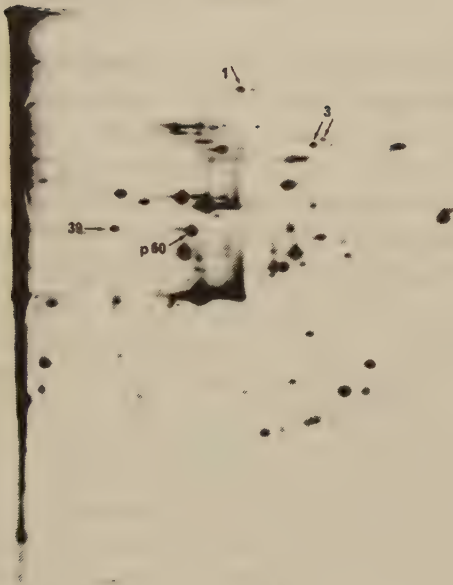


Abb.42. 2-D Fluorogramme von A) Zellysatz, B) cytosolischen Proteinen und C) Triton X-100 extrahierbaren Proteinen PHA-stimulierter, ^3H -Leucin markierter Lymphozyten. Proteine mit quantitativen Unterschieden in den drei verschiedenen Zellfraktionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.10.3. Differenzierung von Proteinen und Glykoproteinen

Die 2-D Analysen der ^3H -Galaktose und ^3H -Fucose markierten Proteine einer lymphoblastoiden Zelllinie ließen keine befriedigenden Hinweise für das Auftreten von Glykoproteinen zu. Die ^3H -Zucker wurden nur schwach metabolisiert. Die Markierung der Glykoproteine reichte eventuell nicht aus, um im 2-D Fluorogramm identifiziert werden zu können.

Nur für wenige Proteine ergaben sich Anhaltspunkte für eine Glykoproteinnatur. Der spot 1 erschien mit Galaktose und mit Fucose leicht markiert. Daneben konnte nach Fucose-Markierung auch das Protein 2 als schwach markierter spot identifiziert werden. Einer der beiden spots des Protein 4 konnte ebenfalls in den Mustern von Galaktose- und Fucose-markierten Zellen beobachtet werden. Eine relativ starke Markierung mit den Kohlehydraten trat in der MW-Region um 45 000 D auf. Dabei war eindeutig ein Protein, das nach ^3H -Leucin-Markierung fast von dem prominenten Aktinspot verdeckt wird, nach ^3H -Galaktose- und ^3H -Fucose-Markierung stark markiert. Kathodal dazu trat nach Kohlehydratmarkierung noch ein charakteristischer Doppelspot auf, der bei Leucinmarkierung nur schwach ausgeprägt war. Einige weitere Proteine in der 45 000 D - Schiene scheinen Glykoproteine darzustellen. In einem MW-Bereich von ca. 33 000 D - 38 000 D trat bei beiden Zuckermarkierungen eine charakteristische Gruppe von mindestens 7 Proteinen auf, die in zwei übereinanderliegenden Spotreihen mit leicht differierenden pI-Werten erschienen. Jedes einzelne dieser Proteine kann nicht einem Protein im ^3H -Leucin-markierten Proteinmuster zugeordnet werden. Jedoch gehören diese Proteine der Gruppe von Proteinen an, die im 2-D Muster Leucin-markierter Proteine leicht anodal in einer MW-Region zwischen dem spot 20 und dem p 30 liegt. Einige schwach markierte Glykoproteine konnten nicht eindeutig einem ^3H -Leucin-markierten Protein zugeordnet werden.

4. DISKUSSION

4.1. Erhöhung der Syntheserate von Proteinen nach Mitogenstimulierung der Lymphozyten

Beim Vergleich der Proteinmuster von unstimulierten und mitogenstimulierten Lymphozyten auf silbergefärbten Gelen konnten je nach Färbemethode 6 Proteine (Silberfärbung nach Wray) bzw. 12 Proteine (Silberfärbung nach Heukeshoven) beobachtet werden, die nach Stimulierung in ihrer quantitativen Ausprägung relativ zu den anderen Proteinen anstiegen (siehe Tab.2). Da die Intensität der Proteinspots bei der Silberfärbung annähernd die Konzentration der Proteine in der Zelle reflektiert, scheint eine echte quantitative Erhöhung dieser Proteine nach Stimulierung zu erfolgen. Die nach Stimulierung der Lymphozyten mit verschiedenen PHA-Konzentrationen und anschließender ^3H -Leucin Markierung erhaltenen 2-D Proteinmuster ließen mit steigender PHA-Konzentration eine spezifisch stärkere Markierung in 21 Proteinspots erkennen (siehe Tab.4). Die Intensität von Proteinspots auf Fluorogrammen hängt weniger von der Konzentration der Proteine in der Zelle als vielmehr von der Syntheserate ($\hat{=}$ ^3H -Leucin-Einbau) eines Proteins ab. Fast alle Proteine, deren quantitative Erhöhung auf silbergefärbten Gelen beobachtet wurde, zeigten auch einen erhöhten ^3H -Leucin-Einbau, da sie während der Stimulierung verstärkt synthetisiert wurden (Vergleiche Tab.2 und 4). Die Proteine, die nur einen verstärkten Turnover aufwiesen, jedoch in der Zelle nicht verstärkt akkumuliert wurden, waren verständlicherweise in silbergefärbten Gelen nicht durch erhöhte Spotstärke aufgefallen. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, daß unter den Proteinen, die nur auf Fluorogrammen quantitativ erhöht waren, auch solche zu suchen sind, die aufgrund biochemischer Charakteristika (wie Aminosäurezusam-

mensetzung) mit den Silberfärbungen schlecht anfärbbar sind.

Vergleichende Analysen von unstimulierten und mitogenstimulierten menschlichen Lymphozyten mit der 2-D Elektrophorese sind kaum beschrieben.

Lester et al. (1981) untersuchten über Pulsmarkierungen mit ^{35}S -Methionin zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulierungsbeginn Veränderungen im 2-D Proteinmuster während der Mitogenstimulierung. Nach 24 h, 48 h und 120 h Stimulierung ergaben sich ähnliche Muster, so daß diese Ergebnisse für einen Vergleich mit den in dieser Arbeit vorgestellten Resultaten herangezogen werden können. Lester et al. beobachteten ein spezifisches quantitatives Ansteigen von 2 Proteinen, einem 50 000 D spot (pI 5.6) und einem 60 000 D spot (pI 6.1). Auf Grund seiner Lage im 2-D Proteinmuster wird eine Identität des 60 000 D Proteins mit dem in dieser Arbeit beschriebenen p 60 (MW 60 000 D, pI 6.05) als sehr wahrscheinlich angenommen. Das quantitative Ansteigen des p 60 wurde in silbergefärbten Gelen und in Fluorogrammen beobachtet. Die erhöhte Synthese eines 50 000 D Proteins konnte nicht bestätigt werden. Weitere, im Laufe der Mitogenstimulierung spezifisch ansteigende Proteine wurden von diesen Autoren nicht beschrieben. Jedoch fanden sie insgesamt eine 10fache Steigerung der Proteinsynthese verbunden mit einer nur 5fachen Steigerung der Proteinkonzentration in der Zelle. Diese Beobachtung läuft daraus hinaus, daß, wie vorher schon diskutiert, die Stimulierung zum Teil nur einen erhöhten Turnover und keine erhöhte Gesamtkonzentration von Proteinen in der Zelle bewirkt. Eine insgesamt steigende Stoffwechselaktivität (^3H -Leucin Einbau) wurde in der vorliegenden Arbeit auch in Abhängigkeit von der PHA-Konzentration beschrieben. Die Unterschiede waren allerdings nicht so stark ausgeprägt, da auch eine geringe PHA-Konzentration (2.5 µg/ml) schon einen deutlich erhöhten Metabolismus verglichen mit unsti-

mulierten Zellen bewirkt. Eine enorme Steigerung der Stoffwechselaktivität konnte beim Vergleich des ^3H -Leucin Einbaus bei LPS-behandelten (praktisch unstimulierte Zellen) und PHA-stimulierten Lymphozyten beobachtet werden (0.3 μCi versus 30 μCi).

Qualitative Veränderungen im Proteinstmuster während der Mitogenstimulierung wurden von Lester et al. nicht gefunden, was in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht.

Da andere detaillierte Untersuchungen von unstimulierten und mitogenstimulierten menschlichen Lymphozyten mit der 2-DE nicht bekannt sind, wurde versucht, sonstige Anhaltspunkte für Veränderungen in Zellproteinen nach Stimulierung in der Literatur zu finden. Denn es erstaunt, daß Lester et al. nur eine spezifische Erhöhung in 2 Proteinen beschrieben, während in der vorliegenden Arbeit wesentlich mehr Veränderungen beobachtet wurden.

Hamaguchi et al. (1980) wiesen mit 1-D Elektrophorese ein 88 000 D Protein nach, das bei verschiedenen Tumorzellen, transformierten Fibroblasten und mitogenstimulierten Lymphozyten exprimiert wurde, während es bei unstimulierten Lymphozyten oder normalen Gewebezellen nicht entdeckt werden konnte. Diese Autoren vermuteten eine Assoziation dieses Proteins mit speziellen Wachstumscharakteristiken proliferierender Zellen. In einer späteren Veröffentlichung identifizierten Hamaguchi et al. (1982 b) dieses 88 kD Protein als einen im 2-D Muster in einem charakteristischen "Doppelschweif" auftretenden Proteinspot. Da dieses Merkmal ebenso auf das in der vorliegenden Arbeit nach Mitogenstimulierung quantitativ erhöhte Protein 6 mit 88 000 D zutrifft und die Lage im 2-D Muster ähnlich ist, kann eine Identität dieser beiden Proteine angenommen werden.

Die Proteine 15 und 16 (MW 55 000 D), deren Ansteigen nach Stimulierung in silbergefärbten Gelen beobachtet wurde,

konnten mit großer Wahrscheinlichkeit als Tubuline identifiziert werden. Denn beim Vergleich mit 2-D Mustern verschiedener Zelltypen anderer Autoren (Bravo und Celis 1982; Bachvaroff et al. 1980) war eine ähnliche Position im Proteinmuster erkennbar.

Bachvaroff et al. (1980) beschrieben das Ansteigen der Syntheserate und das Erscheinen von Komponenten des Cytoskeletons auf Zellmembranen von mitogenstimulierten Lymphozyten und EBV-transformierten Zelllinien. Die Tatsache, daß im Zellysat eine stärkere Ausprägung der Proteine 14, 15 und 16 (α_1 -, α_2 - und β -Tubuline) beobachtet wurde als in der cytosolischen Fraktion, läßt die Anwesenheit dieser Proteine auf der Plasmamembran vermuten und somit die Ergebnisse von Bachvaroff et al. bestätigen.

Für alle anderen und damit für die Mehrheit der nach Mitogenstimulierung ansteigenden Lymphozytenproteine konnten in der Literatur keine konkreten Hinweise gefunden werden. In den letzten Jahren wurde zwar eine Reihe sog. Aktivierungsantigene auf der Zelloberfläche von stimulierten Lymphozyten beschrieben, die im Zusammenhang mit der Proliferation der Zellen stehen, jedoch sind diese Antigene meist über ihre Reaktion mit monoklonalen Antikörpern definiert. Somit wäre eine Identifizierung im 2-D Muster über das MW der Proteine rein spekulativ. Zu diesen Aktivierungsantigenen gehören z.B. der Interleukin-2 (=TCGF)-Rezeptor mit einem MW von 55 - 58 kD auf menschlichen stimulierten T-Zellen (Uchiyama et al. 1981; Leonard et al. 1982; Hemler et al. 1984; Cotner et al. 1983), der Transferrin-Rezeptor mit einem MW von ca. 90 kD auf verschiedenen proliferierenden menschlichen Zellen einschließlich PHA-stimulierten T-Zellen (Trowbridge und Omary 1981; Haynes et al. 1981; Sutherland et al. 1981; Neckers und Cossman 1983; Cotner et al. 1983) oder ein p 72 mit MW 72 kD auf verschiedenen menschlichen Tumoren und stimulierten T-Lymphozyten (Price et al. 1984). Um eine Aussage darüber machen zu können, ob einige nach Stimulierung quantitativ ansteigenden

Proteine solchen Aktivierungsantigenen zuzuordnen sind, müßte mit Hilfe der monoklonalen Antikörper eine Identifizierung dieser Antigene im 2-D Gel angestrebt werden.

4.2. Identifizierung von T- und B-Zell spezifischen Proteinen

4.2.1. Stimulierung der peripheren Blutlymphozyten mit verschiedenen Mitogenen

In der Literatur besteht eine weitgehende Einigkeit darüber, daß PHA beim Menschen vor allem als T-Zell stimulierendes Mitogen wirkt (Ling und Kay 1975; Greaves und Janossy 1972). PWM wird dagegen im allgemeinen als polyklonales T- und B-Zell stimulierendes Mitogen beschrieben (Ling und Kay 1975; Waxdal und Basham 1974; Greaves et al. 1974). Miller (1982) konnte nach PWM-Stimulierung peripherer menschlicher Blutlymphozyten ein Ansteigen der B-Zellen von 15 % auf 40 % - 50 % nachweisen (EAC-Rosetten), während umgekehrt die T-Zellen deutlich abnahmen (50 % versus 10 % E-Rosetten).

Deshalb schien die vergleichende Analyse von PHA- und PWM-stimulierten Lymphozyten ein geeigneter Ansatz für die Differenzierung T- und B-Zell spezifischer Proteine im 2-D Muster zu sein. Entsprechend der Verunreinigung der T-Zellkulturen (PHA) mit B-Zellen und umgekehrt der B-Zellkulturen (PWM) mit T-Zellen wurden nur quantitative Unterschiede im 2-D Proteinmuster erwartet. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch im 2-D Muster keine signifikanten Unterschiede zwischen PHA- und PWM-stimulierten Lymphozyten gefunden werden, die eindeutig auf T- bzw. B-Zellspezifität hingewiesen hätten. Da auch der Nachweis von Oberflächenimmunglobulin-tragenden B-Zellen über Immunfluores-

zenz keine nennenswerte Erhöhung des B-Zell-Anteils in den PWM-Kulturen verglichen mit den PHA-Kulturen erkennen ließ, wurde die T- bzw. B-Zellspezifität der PHA- bzw. PWM-Muster bezweifelt (Waldinger et al. 1985). Weitere Untersuchungen von 2-DE Mustern in Abhängigkeit von der PHA-Konzentration zeigten, daß die drei bei PHA-Stimulierung verglichen mit PWM-Stimulierung quantitativ erhöhten Proteine (siehe Tab.3 / spot 11, 32 und 36) auch bei steigender PHA-Konzentration zunahmen. Diese Variationen reflektieren also eher eine unterschiedlich starke Stimulierung bei PHA- und PWM-Kulturen als eine T- oder B-Zellspezifität. Der qualitative Unterschied in Protein 20 (Tab.3) ist in seiner Bedeutung schwer zu beurteilen, da dieses Protein auch innerhalb der PHA- bzw. PWM-Muster eine heterogene individuelle Ausprägung besaß (siehe auch 3.6.2.).

Zusammenfassend lassen sich diese Ergebnisse dahingehend interpretieren, daß bei den gegebenen Kulturbedingungen sowohl PHA als auch PWM vor allem T-Zell stimulierend wirken, wobei sich PWM als weniger effektives Mitogen erwiesen hat.

Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Miller läßt sich eventuell durch unterschiedliche Kulturbedingungen oder unterschiedliche Mitogenchargen erklären. Auch andere Autoren beobachteten einen relativ geringen Anteil an B-Zellen nach PWM-Stimulierung. Greaves und Janossy (1974) untersuchten die Auswirkungen der PHA- und PWM-Stimulierung auf die Lymphozyten menschlicher Tonsillen, also einem Ausgangsmaterial, das a priori ungefähr gleiche Anteile an T- und B-Zellen (je 50%) enthält. Mit PHA konnten sie insgesamt ca. 50% der Zellen stimulieren, wobei 45% T-Blasten und 5% B-Blasten waren. Das heißt, PHA stimulierte 90% aller T-Zellen und 10% aller B-Zellen. Mit PWM wurden dagegen nur insgesamt 35% der Zellen stimuliert, wobei auf die T-Zellen ein Anteil von 25% (50% der Gesamt-T-Zellen) und auf die B-Zellen ein Anteil von 10% (20% der Gesamt-

B-Zellen) entfiel. Wenn die Verhältnisse im Blut ähnlich liegen, würde nach den Ergebnissen dieser Autoren nur ein Anteil von 3 % stimulierten B-Zellen (20 % von 15 % Gesamt-B-Zellen) nach PWM-Stimulierung zu erwarten sein. Dann wäre es verständlich, wenn sich dieser geringe B-Zell-Anteil im 2-D Muster nicht auswirken würde. Die Beobachtung, daß PHA einen wesentlich größeren Anteil an Zellen stimuliert als PWM wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit bestätigt (siehe 3.1.1.).

Auch Lester et al. (1981) beobachteten sehr ähnliche 2-DE Muster bei PHA- und PWM-stimulierten Zellen. Weitere vergleichende 2-D elektrophoretische Untersuchungen von PHA- und PWM-stimulierten menschlichen Lymphozyten sind nicht bekannt.

4.2.2. Unterschiedliche Ausprägung von Proteinen bei PHA-stimulierten Lymphozyten und EBV-transformierten Zelllinien

Beim Vergleich von PHA-stimulierten Lymphozyten und EBV-transformierten Zelllinien konnten 7 Proteine identifiziert werden, die nach PHA-Stimulierung stärker ausgeprägt waren, und umgekehrt 6 Proteine, die in EBV-transformierten Zellen dominierten (siehe Tab.5). Es liegt zwar nahe, diese Proteine als T- bzw. B-Zell spezifische Proteine zu klassifizieren, jedoch muß eingeräumt werden, daß ein Einfluß der Langzeitkultivierung und der Transformation (siehe unten) bei den EBV-Zelllinien auf die Ausprägung von Proteinspots nicht ausgeschlossen werden kann.

Unterschiede im 2-DE Muster zwischen T- und B-Zellen sind für den Menschen relativ schlecht untersucht. Dies liegt wahrscheinlich vor allem daran, daß für den Menschen eine spezifische B-Zell Stimulierung mit einem Mitogen Schwierigkeiten bereitet.

Takeda et al. (1983) beschrieben im 2-DE Muster von unstimulierten T- und B-Zellen nach ^{125}J -Zelloberflächenmarkierung ein für menschliche T-Zellen spezifisches Protein mit 100 000 D (Tp100) und ein B-Zell spezifisches Protein mit 74 000 D (Bp 74). Ein Protein mit 20 000 D schien ebenso auf T-Zellen beschränkt zu sein. Das Tp100 wies wie das in der vorliegenden Arbeit bei stimulierten T-Zellen beobachtete Protein 4 mit 96 000 D einen heterogenen pI auf. Es kann demnach eine Identität dieser beiden Proteine angenommen werden.

Lester et al. (1982) untersuchten die menschlichen autologen Zelllinien CCRF-HSB-2 (T-Zelllinie) und CCRF-SB (B-Zelllinie) vergleichend mit der 2-DE. Sie fanden nach ^3H -Leucin Markierung nur wenige qualitative und einige quantitative Unterschiede, die sie jedoch nicht näher in ihrem pI und MW definierten, so daß ein Vergleich mit den hier vorliegenden Ergebnissen bei PHA-stimulierten und EBV-transformierten Zellen nicht möglich ist.

Unterschiede im Proteinmuster von T- und B-Zellen sind bei der Maus wesentlich besser untersucht als beim Menschen. Im Gegensatz zum Menschen ist bei der Maus eine spezifische Stimulierung der T-Zellen mit ConA und der B-Zellen mit LPS möglich (Ling und Kay 1975; Iscove und Melchers 1978).

Takeda et al. (1983) beschrieben bei der Maus T-Zell spezifische Proteine mit 100 kD, 40 kD und 26 - 28 kD, wobei das 100 kD Protein äquivalent dem Tp100 beim Menschen ist. Umgekehrt wurden von diesen Autoren B-Zell spezifische Proteine mit 110 kD, 80 kD, 66 kD und 60 kD beobachtet, die allerdings im 2-D Muster nicht als scharfe spots, sondern als "verschmierte" Banden auftraten. Diese Untersuchungen wurden an Milzzellen eines Mausinzuchtstammes nach ConA- bzw. LPS-Stimulierung durchgeführt. Neben der spezifischen Stimulierbarkeit der B-Lymphozyten mit LPS tritt bei der Maus noch der Vorteil hinzu, daß Organe wie die Milz für die Versuche zur Verfügung stehen, wo von vorneherein ungefähr

gleiche Anteile an T- und B-Zellen vorliegen.

Mit einem ähnlichen Versuchsansatz, nämlich mit einer vergleichenden 2-DE von ConA- und LPS-stimulierten Lymphozyten aus der Milz von zwei verschiedenen Mauseinzuchtstämmen konnten Braun et al. (1985) die Ergebnisse von Takeda et al. noch erweitern. 13 T-Zell spezifische und 8 B-Zell spezifische Proteine wurden nach Silberfärbung der 2-D Gele beobachtet.

Einige der von Takeda et al. und Braun et al. veröffentlichten T- bzw. B-Zell spezifischen Proteine bei der Maus könnten mit den hier genannten Unterschieden zwischen T- (PHA) und B- (EBV) Zellen beim Menschen korrelieren.

Wie schon erwähnt, scheint ein Tp100 in den Untersuchungen von Takeda et al. bei Maus und Mensch aufzutreten und mit dem bei PHA-stimulierten T-Zellen quantitativ erhöhten Protein 4 (MW 96 000 D) identisch zu sein. Braun et al. beobachteten bei der Maus ein Tp14 (MW 14 000 D, pI 6.75), das dem Protein 30 mit 17 000 D (pI 6.8) bei PHA-stimulierten menschlichen T-Zellen entsprechen könnte. Allgemein fanden Braun et al. bei den T-Zell spezifischen Proteinen der Maus eine auffallende Begrenzung auf den pH-Bereich von 6.0 - 6.8. Dieses Ergebnis konnte für 5 der 7 PHA-spezifischen Proteine beim Menschen bestätigt werden (siehe Tab.5).

Die von Takeda et al. beschriebenen B-Zell spezifischen Proteine bei der Maus lagen alle in einem höheren MW-Bereich als die bei den EBV-transformierten B-Zellen spezifisch erhöhten Proteinspots. Jedoch besitzt das von Braun et al. beschriebene Bp40 (MW 40 000 D, pI 6.3) eine ähnliche Lage wie spot 19 (MW 39 000 D, pI 6.6), was eine Äquivalenz dieser Proteine bei Maus und Mensch vermuten läßt. Weiterhin besaßen auch bei Braun et al. alle B-Zell spezifischen Proteine ein MW $\geq$ 40 000 D, während alle bei den EBV-transformierten Zelllinien als B-Zell spezifische Proteine in Frage kommenden spots ein MW $<$ 40 000 aufwiesen (siehe Tab.5).

Insgesamt gesehen scheinen die Korrelationen zwischen T- und B-Zellen bei Mensch und Maus nicht besonders auffallend zu sein. Jedoch darf die unterschiedliche Untersuchungsmethode, und zwar ^3H -Leucin markierte Zellen (Fluorographie) versus ^{125}J -Markierung (Autoradiographie) und unmarkierte Zellen (Silberfärbung) nicht übersehen werden.

4.3. Fehlen von geschlechtsspezifischen Unterschieden

Beim Vergleich der Proteinmuster männlicher und weiblicher Blutspender konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede identifiziert werden.

Müller et al. (1984) beschrieben bei XO und XY Fibroblasten aus einem monozygoten Zwillingspaar zwei Y-abhängige Polypeptide mit 38 000 D und 30 000 D im 2-D Proteinmuster. Diese Ergebnisse konnten bei den PHA-stimulierten Lymphozyten nicht bestätigt werden. Abgesehen davon, daß die 2-D Muster von Fibroblasten und Lymphozyten nur schwer vergleichbar sind, wurde in der vorliegenden Arbeit bei den männlichen und weiblichen Individuen im 2-D Muster der Lymphozyten im Bereich von 38 000 D und 30 000 D kein Unterschied gefunden.

4.4. Individuelle Variationen im 2-D Proteinmuster

4.4.1. Individuelle Variationen ohne erkennbaren Vererbungsmodus

Die quantitativen und einige der qualitativen Variationen ließen innerhalb der Familien keinen klaren Erbgang erkennen.

Quantitative individuelle Unterschiede wurden v.a. bei solchen Proteinen beobachtet, die nach Stimulierung erhöhte Syntheseraten aufwiesen. Es könnte sich also um Variationen handeln, die mit der individuellen Stimulierbarkeit mit Mitogenen zusammenhängen. Einige Beobachtungen sprechen dafür, daß die quantitativen Variationen genetisch determiniert sind. Die Intensität der Proteinspots wies bei mehrfach durchgeführter Stimulierung innerhalb eines Individuums eine erstaunliche Konstanz auf (siehe Abb.17), und ebenso wurde bei monozygoten Zwillingen eine identische Ausprägung in den quantitativ variierenden Proteinen beobachtet (siehe Abb.40). Die quantitativen individuellen Variationen scheinen also nicht durch eventuell leicht variierende Bedingungen während der Zellkultivierung oder Zellpräparation zu entstehen, sondern schon primär individuell vorgegeben zu sein. Eine genetische Grundlage von quantitativen Variationen wurde ebenfalls von Klose (1982) aufgrund der Ergebnisse bei verschiedenen Mausinzuchtstämmen angenommen.

Einige Variationen in Bezug auf An- oder Abwesenheit von Proteinen scheinen auch genetisch determiniert zu sein, ohne daß jedoch eine einfache genetische Transmission zu erkennen war. Im MW-Bereich um 45 000 D traten über einen weiten pH-Bereich bei verschiedenen Individuen eine mehr oder weniger große Anzahl von Proteinen in verschiedenen Positionen und mit unterschiedlicher Intensität auf. In-

nerhalb eines Individuums und bei monozygoten Zwillingen waren die Proteinmuster identisch, was auf eine genetische Determination hinweist.

4.4.2. Genetische Polymorphismen

In der vorliegenden Arbeit konnten 6 polymorphe Proteine im 2-D Muster PHA-stimulierter Lymphozyten gezeigt werden. Die Identifizierung dieser Proteine als genetische Polymorphismen beruht auf folgenden Kriterien:

- Jedes Protein existiert in mindestens zwei verschiedenen IEF-Varianten, die phänotypisch in homozygoter oder heterozygoter Form auftreten können.
- Ein Vergleich der Intensität der Proteinspots bei den homozygoten und heterozygoten Phänotypen läßt eine Gendosisabhängigkeit in der Spotstärke erkennen.
- Die Phänotypenverteilungen der 6 polymorphen Proteine waren innerhalb der 12 untersuchten Familien immer mit einer einfachen genetischen Transmission von allelen Genprodukten erklärbar (kodominante Vererbung).
- Monozygote Zwillinge zeigten eine identische Ausprägung in den Phänotypen aller 6 Proteine.

Bei drei der polymorphen Proteine konnten eindeutig zwei IEF-Varianten unterschieden werden, die in allen drei theoretisch möglichen Phänotypen auftraten (zwei homozygote und ein heterozygoter Phänotyp). Bei zwei weiteren Polymorphismen läßt sich das Fehlen des zweiten homozygoten Phänotyps durch die relativ geringe Genfrequenz des seltenen Allels erklären. Außerdem stimmen bei den fünf genannten Polymorphismen (p 23, p 30, p 40, p 60 und p 66) die in der Stichprobe von 44 genetisch nicht-verwandten Individuen beobachteten Phänotypenverteilungen sehr gut mit den aus den Genfrequenzen berechneten erwarteten Phänotypenverteilungen überein. All diese Ergebnisse liegen so klar auf

der Hand, daß diese Polymorphismen keiner weiteren Diskussion bedürfen.

Im Gegensatz dazu stellt sich der Polymorphismus des p 75 Proteins wesentlich komplexer dar. Es sind hier zwei Hypothesen, nämlich die Annahme von drei oder sechs verschiedenen Allelen zu diskutieren. Die drei IEF-Varianten a, b und c sind aufgrund ihrer Unterschiede im pI und MW noch gut zu differenzieren, obwohl auch hier die eindeutige Identifizierung der homozygoten Phänotypen schwerer fällt als die der heterozygoten Phänotypen. Die zusätzlich postulierten Varianten (d, e und f) unterscheiden sich von einer der drei Varianten a, b oder c nur durch einen leicht unterschiedlichen pI. So könnte man der Theorie von 6 Allelen das Argument einer methodisch bedingten unterschiedlichen Trennung in der IEF entgegenhalten (leicht differierender pH-Gradient o.ä.). Jedoch waren die Phänotypen innerhalb eines Individuums reproduzierbar und eine genetische Transmission konnte für alle 6 Varianten gezeigt werden. Um sich endgültige Klarheit über diesen Polymorphismus zu verschaffen, müßte die Zahl der untersuchten Individuen und Familien wesentlich größer sein. Auch die berechneten Genfrequenzen können bei der Komplexität dieses Polymorphismus und bei der entsprechend großen Zahl an unterschiedlichen Phänotypen nur als Näherungswerte betrachtet werden, da die untersuchte Stichprobe zu klein ist, um genaue Werte erwarten zu können. Das selbe trifft natürlich für die teilweise auftretende Diskrepanz zwischen beobachteter und erwarteter Phänotypenverteilung zu.

Genetische Polymorphismen bei zellulären Proteinen menschlicher Lymphozyten wurden in den letzten Jahren von der Arbeitsgruppe von Hamaguchi und Kondo (Hamaguchi et al. 1981, 1982 a, 1982 b, 1982 c; Kondo et al. 1984 a, 1984 b, 1985, 1986) in einer Stichprobe der japanischen Bevölkerung und von Goldman und Merrill (1983) bei US-Amerikanern be-

schrieben. Die in der vorliegenden Arbeit in einer Stichprobe der süddeutschen Population beobachteten Polymorphismen sollen im Folgenden vergleichend mit den Ergebnissen der japanischen und der amerikanischen Studie diskutiert werden.

Die Genfrequenzen des p 23 Proteins lagen in der süddeutschen Stichprobe bei 0.523 für p 23^a und 0.477 für p 23^b. In jüngster Zeit beschrieben Kondo et al. (1986) in der japanischen Bevölkerung einen Polymorphismus für ein Protein mit 20 000 D (CP 20) mit Genfrequenzen von 0.955 und 0.045 für die beiden Allele. Bei einem Vergleich der Proteinmuster erscheint eine Äquivalenz des p 23 und CP 20 zwar nicht wahrscheinlich, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Denn eine direkte Zuordnung der korrespondierenden Proteinspots fällt nicht leicht, da Kondo et al. erstens nur cytosolische Proteine auftrennten, zweitens einen anderen pH-Gradienten verwendeten und drittens die Proteinmuster anhand silbergefärbter Gele analysierten. Sollte es sich bei den beiden Polymorphismen tatsächlich um die gleichen Proteine handeln, so wäre ein drastischer Unterschied in den Genfrequenzen der zwei Allele in der japanischen Bevölkerung und der süddeutschen Population zu verzeichnen.

Das p 30 Protein erinnert in der Position seiner Varianten an das von Kondo et al. (1984 a) beschriebene 31 K Protein. Die Genfrequenzen in der süddeutschen Population von 0.977 (p 30^a) und 0.023 (p 30^b) differieren zwar nicht auffallend von den in Japan beobachteten Genfrequenzen von 0.940 und 0.060, dennoch sollte die fast dreimal so große Häufigkeit des seltenen Allels in der japanischen Bevölkerung nicht übersehen werden. Das p 30 Protein und das 31 K Protein könnten mit dem von Goldman und Merrill (1983) in einer Stichprobe aus der USA beschriebenen Polymorphismus des NIMH-16 (MW 31 000 D) korrelieren. Die Genfrequenzen in der amerikanischen und japanischen Stichprobe waren iden-

Tab.23. Genfrequenzen der in Japan, USA und Süddeutschland beschriebenen Polymorphismen bei zellulären Proteinen menschlicher stimulierter Lymphozyten.

Süddeutsche Bevölkerung	Japanische Bevölkerung (Hamaguchi et al. und Kondo et. al.)	US-Amerikaner (Goldman und Merril)
p 30	C 31 K	NIMH-16
p 30 ^a 0.977	C31P ¹ 0.940	p 0.94
p 30 ^b 0.023	C31P ² 0.060	q 0.06
p 40	CP 38	NIMH-1
p 40 ^a 0.845	CP 38 ¹ 0.899	p 0.77
p 40 ^b 0.155	CP 38 ² 0.101	q 0.23
p 66	LC 64 K	NIMH-4
p 66 ^a 0.875	LC64P ¹ 0.936	p 0.84
p 66 ^b 0.125	LC64P ² 0.064	q 0.16

tisch (siehe Tab.23).

Weiterhin traten das polymorphe Protein p 40 und das von Kondo et al. (1985) beschriebene 38 K Protein in einer ähnlichen Position im 2-D Muster auf, so daß eine Identität dieser Proteine angenommen wird. Die Genfrequenzen für das p 40 in der süddeutschen Stichprobe ergaben sich zu 0.845 für p 40^a und 0.155 für p 40^b, während in der japanischen Bevölkerung mit Frequenzen von 0.899 und 0.101 das seltene Allel weniger häufig vorkommt. Der Polymorphismus eines 40 000 D Proteins (NIMH-1) wurde auch von Goldman und Merrill (1983) unter US-Amerikanern beobachtet. Die Genfrequenzen lagen jedoch dort für das seltene Allel mit 0.23 höher als in der süddeutschen und japanischen Stichprobe (siehe Tab.23).

Weder in der japanischen noch in der amerikanischen Studie wurde ein Polymorphismus beschrieben, der dem p 60 Protein äquivalent sein könnte. Der p 60 Polymorphismus wurde also in der hier untersuchten süddeutschen Bevölkerung erstmals beobachtet. Mit Genfrequenzen von 0.968 für p 60^a und 0.012 für p 60^b tritt das b-Allel auch in der süddeutschen Population recht selten auf.

Das polymorphe Protein p 66 mit Genfrequenzen von 0.875 für p 66^a und 0.125 für p 66^b ist aufgrund seiner Lage im 2-D Muster wahrscheinlich identisch mit dem von Hamaguchi et al. (1982 a) beschriebenen 64 K Protein und mit dem von Goldman und Merrill (1983) publizierten NIMH-4 (MW 67 000 D). Die Genfrequenzen liegen in Japan bei 0.936 bzw. 0.064 und in den USA bei 0.84 bzw. 0.16. Die Frequenz des seltenen Allels nimmt also von Japan über Süddeutschland nach USA hin zu (siehe Tab.23).

Ein mit dem p 75 Protein vergleichbarer Polymorphismus wurde von der japanischen und der amerikanischen Arbeitsgruppe nicht beobachtet. Beide Teams untersuchten nur die cytosolischen Proteine der Lymphozyten, während die Ergebnisse

der vorliegenden Arbeit eher dafür sprechen, daß dieses Protein nicht der cytosolischen Fraktion angehört (siehe 3.10.).

Zusammenfassend wurden wahrscheinlich die Polymorphismen der p 30, p 40 und p 66 Proteine auch in einer japanischen und einer amerikanischen Stichprobe beobachtet, während die Proteine p 60 und p 75 sicherlich und das p 23 mit großer Wahrscheinlichkeit in der süddeutschen Stichprobe neu beschriebene Polymorphismen darstellen.

Es wurden aber auch umgekehrt einige polymorphe Proteine, die Hamaguchi und Kondo anhand der japanischen Stichprobe oder Goldman und Merrill anhand der amerikanischen Stichprobe veröffentlichten, in der süddeutschen Population nicht entdeckt.

Hamaguchi et al. (1981, 1982 a, 1982 b, 1982 c) und Kondo et al. (1984 a, 1984 b, 1985, 1986) konnten in der japanischen Bevölkerung durch Familienuntersuchungen und populationsgenetische Untersuchungen insgesamt 8 Polymorphismen bei cytosolischen Proteinen PHA-stimulierter Lymphozyten nachweisen. Die 5 Polymorphismen, die in der Stichprobe aus Süddeutschland nicht gefunden wurden, stellten zum Teil sehr schwache Proteinspots auf Coomassie-gefärbten Gelen dar (100 K, 49 K, 40 K), die auf Fluorogrammen ³H-Leucin markierter Proteine unentdeckt bleiben können (zu schwache Markierung) oder lagen in einem basischen pH-Bereich (33 K), der mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten pH-Gradienten kaum reproduzierbar zu erfassen war. Andererseits könnten diese Proteine in der cytosolischen Fraktion besser angereichert sein als in der in dieser Arbeit untersuchten Gesamtproteinfraktion. Weiterhin ist nicht auszuschließen, daß diese Polymorphismen in der süddeutschen Population überhaupt nicht oder mit einer sehr geringen Frequenz des seltenen Allels auftreten, so daß sie in der untersuchten Stichprobe von 44 genetisch nicht-verwandten Personen nicht beobachtet wurden. Hier wäre anzumerken, daß Hamaguchi und

Kondo in ihrer letzten Veröffentlichung (1986) bei einer Stichprobe von fast 190 Individuen angekommen sind.

Goldman und Merrill (1983) beobachteten in der Stichprobe von US-Amerikanern 19 polymorphe Proteine. Es wurden also 16 Polymorphismen beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnten. Die meisten dieser Proteine besaßen einen wesentlich basischeren pI als das Aktin (Referenzprotein im 2-DE Muster), lagen also in einem pH-Bereich, dessen relativ schlechte Reproduzierbarkeit in dieser Arbeit beschrieben wurde, und stellten sehr schwache Proteinspots dar (^{14}C -Leucin Markierung). Somit wäre ein Fehlen dieser Polymorphismen in den hier untersuchten 2-D Fluorogrammen zu erklären. Andererseits erscheint eine Zahl von 19 Polymorphismen im 2-D Muster von zellulären Proteinen überraschend, um nicht zu sagen unrealistisch hoch, so daß die Ergebnisse von Goldman und Merrill etwas kritisch betrachtet werden sollten. Es wurde zwar das Vorhandensein von homozygoten und heterozygoten Phänotypen und eine Gendosisabhängigkeit in der Spotstärke der Varianten beschrieben, jedoch führten diese Autoren keine Familienuntersuchungen durch, so daß ein Nachweis der genetischen Transmission der Varianten ausblieb. Weiterhin wurden die meisten Polymorphismen nur an einer Stichprobe von 28 Individuen und nur einige Polymorphismen an einer größeren Stichprobe von 43 Individuen untersucht, weshalb die hohe Zahl an Polymorphismen noch mehr erstaunt.

4.4.3. Häufigkeit von individuellen qualitativen Variationen bei zellulären Proteinen

Unter den ca. 300 - 400 nach längerer Expositionszeit gut differenzierbaren Proteinspots auf den 2-D Fluorogrammen menschlicher stimulierter Lymphozyten zeigten 6 Proteine genetische Polymorphismen. Dies entspricht einer Variabilität in 1.5% - 2% der untersuchten Proteine.

In den letzten Jahren wurde mit Hilfe der 2-DE die genetische Variabilität von zellulären Proteinen bei verschiedenen Species und Geweben oder Organen untersucht.

Beim Menschen sind neben den Blutzellen die Fibroblasten das am ehesten verfügbare Material. Bei der 2-D Analyse menschlicher Fibroblastenproteine fanden Walton et al. (1979), McConkey et al. (1979) und Klose et al. (1983) 1% - 2% qualitativ variante Proteine.

Daneben wurde die genetische Variabilität vor allem bei der Maus untersucht, wo, anders als beim Menschen, verschiedene Organe für die Versuche zur Verfügung stehen. Racine und Langley (1980) beobachteten im 2-D Proteinmuster von Nierenextrakten bei wilden Populationen der Maus eine genetische Variabilität von 2%. Klose et al. (1981, 1982) fanden 1% - 2% qualitativ variante Proteinspots beim Vergleich der Proteinmuster verschiedener Organe von 4 Mausinzuchtstämmen. Hierbei muß erwähnt werden, daß Klose als qualitative Variationen nur solche Proteine beschreibt, die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität aufweisen, was den in dieser Arbeit vorgestellten polymorphen Proteinen gleichzusetzen wäre.

Auf dem Hintergrund der Ergebnisse der genetischen Variabilität bei menschlichen Fibroblasten und bei verschiedenen Organen der Maus erscheint die in der vorliegenden Arbeit bei zellulären Proteinen menschlicher Lymphozyten beobachtete genetische Variabilität von 1.5% - 2% realistisch.

Hamaguchi und Kondo haben die genetische Variabilität bei menschlichen Lymphozytenproteinen in ihren Arbeiten nie in Zahlen ausgedrückt. Jedoch läßt sich bei einer Anzahl von 8 Polymorphismen bei ca. 300 untersuchten Proteinen eine Häufigkeit von ca. 2.6% genetischer Variationen ableiten. Dieser Wert liegt zwar etwas höher als die in der vorliegenden Arbeit ermittelte genetische Variabilität, jedoch verwendeten Hamaguchi und Kondo leicht variierende Methoden bei der 2-D Analyse (unterschiedliche pH-Gradienten,

Coomassie- und Silberfärbungen, Fluorogramme), so daß die Zahl an tatsächlich untersuchten Proteinen eventuell höher eingeschätzt werden muß. Zweitens untersuchten sie nur cytosolische Proteinfractionen. Die genetische Variabilität scheint bei cytosolischen Proteinen höher zu sein als bei Membranproteinen oder Gesamtzellproteinen. Bei verschiedenen Organen der Maus konnte Klose (1982) 1% qualitativ variante Proteine im Cytosol, jedoch keine qualitativen Variationen bei Membranproteinen nachweisen. Drittens war die Stichprobe bei Hamaguchi und Kondo zuletzt schon ziemlich groß (ca. 190 Individuen). Mit steigender Zahl der untersuchten Personen ist natürlich auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Entdeckung neuer Polymorphismen zu erwarten. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls bei einer Stichprobe von 30 nicht-verwandten Individuen und bei Analyse der genetischen Variabilität in 7.5% - 20% Gradientengelen nur zwei Polymorphismen sicher nachgewiesen werden (Waldinger et al. 1985), während in einer größeren Stichprobe von 44 genetisch nicht-verwandten Personen und bei Analyse in 10% Gelen die Zahl auf 6 Polymorphismen anstieg. Der Einfluß der Größe der Stichprobe und der Analysemethode wird hier deutlich. Somit ist die Diskrepanz zwischen 1.5% - 2% und 2.6% genetischer Variabilität nicht erstaunlich.

Die Zahl von 19 polymorphen Proteinen, die von Goldman und Merril (1983) publiziert wurde, würde jedoch einer Häufigkeit von ca. 10% (19 / 186 untersuchten Proteinen) genetischen Variationen im 2-D Muster entsprechen, was aufgrund der Ergebnisse aller anderen Untersuchungen als extrem hoch empfunden wird (siehe auch 4.4.2.).

Im allgemeinen kann also unter den mit 2-D Elektrophorese differenzierbaren zellulären Proteinen eine wesentlich geringere genetische Variabilität (qualitative Variationen) beobachtet werden als aus den früheren Untersuchungen von Enzymen mit 1-D Elektrophoresen mit meist nachfolgenden

spezifischen Enzymfärbungen bekannt ist. Für den Menschen wurden unter den etwa 70 untersuchten Genorten für Enzyme 30 % polymorphe Systeme gefunden (Harris 1975). Diese Diskrepanz in der Häufigkeit genetischer Variationen liegt wahrscheinlich daran, daß mit der 2-D Elektrophorese andere Proteingruppen analysiert werden als mit den 1-D Elektrophoresemethoden. Die auf den 2-D Mustern differenzierbaren Proteine stellen eher Proteine dar, die in stöchiometrischen Mengen in der Zelle vorkommen (v.a. Strukturproteine oder Membranproteine), während die meist in katalytischen Mengen vorkommenden Enzyme im 2-D Muster unterrepräsentiert sind. Die Strukturproteine mögen wegen der Komplexität der intrazellulären Organisation und wegen der zahlreichen makromolekularen Interaktionen wesentlich konservativer sein als die löslichen Proteine (McConkey 1982).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die metabolisch mit ^3H -Leucin markierten oder unmarkierten zellulären Proteine menschlicher unstimulierter und mitogen-stimulierter Lymphozyten des peripheren Blutes und EBV-transformierter lymphoblastoider Zelllinien wurden mit einer zwei-dimensionalen Elektrophorese (IEF/SDS-PAGE) analysiert. Die vergleichende Untersuchung von unstimulierten, PHA- und PWM-stimulierten und EBV-transformierten Zellen sollte Veränderungen im Proteinmuster nach Stimulierung der Lymphozyten aufzeigen und die Identifizierung T- bzw. B-Zell-spezifischer Proteine ermöglichen. 12 Familien und 44 genetisch nicht-verwandte Individuen wurden anhand ^3H -Leucin markierter PHA-stimulierter Lymphozyten vergleichend untersucht, um die Frage nach dem Vorhandensein von individuellen Unterschieden und genetischen Polymorphismen im 2-D Proteinmuster beantworten zu können.

Je nach Visualisierungsmethode der Proteine auf den 2-D Gelen stieg nach Stimulierung mit PHA die Syntheserate von 12 Proteinen (Silberfärbung) bzw. 21 Proteinen (Fluorographie ^3H -Leucin markierter Proteine) im 2-D Muster an. Qualitative Unterschiede wurden nach Stimulierung nicht beobachtet.

Die 2-D Muster PWM-stimulierter Lymphozyten spiegelten eher die Muster weniger gut stimulierter T-Zellen als die von B-Zellen wieder. PWM wirkte ebenso wie PHA vor allem T-Zell-stimulierend, nur in etwas geringerem Ausmaß. Durch den Vergleich der Proteinmuster PHA-stimulierter Lymphozyten und EBV-transformierter Zelllinien konnten 7 Proteine beschrieben werden, die als T-Zell-spezifische Proteine in Frage kommen, und umgekehrt 6 Proteine, die spezifisch für die B-Zellen waren. Die meisten Unterschiede stellten jedoch nur quantitative Variationen dar. Ein Einfluß der Langzeitkultivierung der EBV-Zelllinien auf das Proteinmuster kann nicht ausgeschlossen werden.

Individuelle Variationen im 2-D Proteinmuster traten in Form von quantitativen und qualitativen Unterschieden auf. Für quantitativ variierende Proteinspots und für einige der qualitativen Variationen wird zwar eine genetische Determination vermutet, da die Ausprägung dieser Proteine bei wiederholter Lymphozytenstimulierung innerhalb eines Individuums und bei monozygoten Zwillingen konstant war, es wurde jedoch kein einfacher Vererbungsmodus beobachtet.

Dagegen konnten 6 Proteine mit genetischem Polymorphismus nachgewiesen werden. Bei diesen Proteinen waren immer mindestens zwei verschiedene IEF-Varianten zu differenzieren, die phänotypisch in homozygoter oder in heterozygoter Form auftraten. Es wurden also entweder nur einer der varianten Proteinspots oder zwei Proteinspots nebeneinander exprimiert. Die IEF-Varianten aller 6 polymorphen Proteine verhielten sich wie allele Genprodukte je eines Genortes. Die genetische Hypothese wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: 1) Die Phänotypenverteilung innerhalb der 12 untersuchten Familien ließ sich immer durch eine einfache genetische Transmission der Allele erklären. 2) Eine Gendosisabhängigkeit war beim Vergleich der homozygoten und der heterozygoten Phänotypen eindeutig zu erkennen. 3) Monozygote Zwillinge wiesen identische Phänotypen in allen 6 polymorphen Proteinen auf.

Während 5 der polymorphen Proteine (p 23, p 30, p 40, p 60 und p 66) zwei unterschiedliche Allele besaßen, mußten bei einem Protein mindestens 3 oder sogar 6 Allele angenommen werden (p 75).

Aus der Phänotypenverteilung bei 44 genetisch nicht-verwandten Individuen wurden die Genfrequenzen für die einzelnen Allele berechnet. Sie lagen für das häufige Allel der 6 polymorphen Proteine zwischen 0.988 und 0.427 und für das selten(st)e Allel zwischen 0.477 und 0.012. Berücksichtigt man nur die polymorphen Proteine, so war eine individuelle Variabilität bei 1.5 % - 2 % der zellulären

Proteine zu verzeichnen.

Altersspezifische und geschlechtsspezifische Unterschiede im 2-D Proteinmuster wurden nicht beobachtet.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Anderson, L. und Anderson, N.G. (1977):
High resolution two-dimensional electrophoresis of
human plasma proteins. -
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 5421 - 5425.
- Anderson, N.G. und Anderson, N.L. (1978 a):
Analytical techniques for cell fractions: XXI. Two-di-
mensional analysis of serum and tissue proteins: Mul-
tiple isoelectric focusing. -
Anal. Biochem., 85 : 331 - 340.
- Anderson, N.L. und Anderson, N.G. (1978 b):
Analytical techniques for cell fractions: XXII. Two-di-
mensional analysis of serum and tissue proteins: Mul-
tiple gradient slab gel electrophoresis. -
Anal. Biochem., 85 : 341 - 354.
- Anderson, N.L., Taylor, J., Scandora, A.E., Coulter, B.P.
und Anderson, N.G. (1981):
The TYCHO system for computer analysis of two-dimensi-
onal gel electrophoresis patterns. -
Clin. Chem., 27 : 1807 - 1820.
- Aquadro, C.F. und Avise, J.C. (1981):
Genetic divergence between rodent species assessed by
using two-dimensional electrophoresis. -
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 3784 - 3788.
- Bachvaroff, R.J., Miller, F. und Rapaport, F.T. (1980):
Appearance of cytoskeletal components on the surface
of leukemia cells and of lymphocytes transformed by
mitogens and Epstein-Barr virus. -
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 4979 - 4983.
- Böyum, A. (1986):
Separation of leukocytes from blood and bone marrow. -
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 (Suppl. 97): 9 - 90.

Bonner, W.M. und Laskey, R.A. (1974):

A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. -

Eur. J. Biochem., 46 : 83 - 88.

Bossinger, J., Miller, M.J., Vo, K.-P., Geiduschek, E.P. und Xuong, N.-H. (1979):

Quantitative analysis of two-dimensional electrophoretograms. - J. Biol. Chem., 254 : 7986 - 7998.

Braun, A., Waldinger, D. und Cleve, H. (1985):

Differences in two-dimensional patterns of cellular proteins from murine T- and B- lymphocytes after mitogenic stimulation. -

Electrophoresis, 6 : 512 - 516.

Bravo, R. und Knowland, J.S. (1979):

Classes of proteins synthesized in oocytes, eggs, embryos and differentiated tissues of *Xenopus laevis*. -

Differentiation, 13 : 101 - 108.

Bravo, R. und Celis, J.E. (1980):

Gene expression in normal and virally transformed mouse 3T3B and hamster BHK21 cells. -

Exp. Cell Res., 127 : 249 - 260.

Bravo, R. und Celis, J.E. (1982):

Up dated catalogue of HeLa cell proteins: Percentages and characteristics of the major cell polypeptides labelled with a mixture of 16 ¹⁴C-labelled amino acids. - Clin. Chem., 28 : 766 - 781.

Celis, J.E., Bravo, R., Larsen, P.M., Fey, S.J., Bellatin, J. und Celis, A. (1984):

Expression of cellular proteins in normal and transformed human cultured cells and tumors: Two-dimensional gel electrophoresis as a tool to study neoplastic transformation and cancer. -

in: Celis, J.E. und Bravo, R. (Eds.), Two-dimensional gel electrophoresis of proteins: Methods and applica-

tions, Academic Press New York, pp. 307 - 362.

Comings, D.E. (1979):

Pc 1 Duarte, a common polymorphism of a human brain protein, and its relationship to depressive disease and multiple sclerosis. -

Nature, 277 : 28 - 32.

Comings, D.E. (1982):

Two-dimensional gel electrophoresis of human brain proteins: IV. Disorders of glial proliferation and a polymorphism of glial fibrillary acidic protein - GFAP Duarte. -

Clin. Chem., 28 : 805 - 812.

Cotner, T., Williams, J.M. Christenson, L., Shapiro, H.M., Strom, T.B. und Strominger, J. (1983):

Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation. Antigen expression and DNA content. -

J. Exp. Med., 157 : 461 - 472.

Cullen, B.R., Emigholz, K. und Monahan, J.J. (1980):

Protein patterns of early mouse embryos during development. - Differentiation, 17 : 151 - 160.

Dunn, M.J. und Burghes, A.H.M. (1983 a):

High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: I. Methodological procedures. - Electrophoresis, 4 : 97 - 116.

Dunn, M.J. und Burghes, A.H.M. (1983 b):

High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: II. Analysis and applications. - Electrophoresis, 4 : 173 - 189.

Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., Zajak, B., Henle, G. und Henle, W. (1966):

Morphological and virological investigation on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). -

J. Natl. Cancer Inst., 37 : 547 - 559.

Garrels, J.I. (1979):

Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. -
J. Biol. Chem., 254 : 7961 - 7977.

Giometti, C.S. und Anderson, N.L. (1981):

A variant of human nonmuscle tropomyosin found in fibroblasts by using two-dimensional electrophoresis. -
J. Biol. Chem., 256 : 11840 - 11846.

Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza, E. und Righetti, P. (1981):

SDS-gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and high resolution two-dimensional electrophoresis in horizontal, ultrathin-layer polyacrylamide gels. -
in: Allen, R.C. und Arnaud, P. (Eds.), Electrophoresis '81, de Gruyter Berlin, pp. 257 - 270.

Goldman, D., Merril, C.R., Polinski, R.J. und Ebert, M.H. (1982):

Lymphocyte proteins in Huntington's disease: Quantitative analysis by use of two-dimensional electrophoresis and computerized densitometry. -
Clin. Chem., 28 : 1021 - 1025.

Goldman, D. und Merril, C.R. (1983):

Human lymphocyte polymorphisms detected by quantitative two-dimensional electrophoresis. -
Am. J. Hum. Genet., 35 : 827 - 837.

Goldman, D. und Merril, C.R. (1984):

Two-dimensional gel electrophoresis for studies of inborn errors of metabolism. -
in: Celis, J.E. und Bravo, R. (Eds.), Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. Methods and applications; Academic Press New York, pp. 241 - 258.

Goldman, D., Goldin, L.R., Rathnagiri, P., O'Brien, S.J., Egeland, J.A. und Merril, C.R. (1985):

Twenty-seven protein polymorphisms by two-dimensional

electrophoresis of serum, erythrocytes and fibroblasts in two pedigrees. -

Am. J. Hum. Genet., 37 : 898 - 911.

Greaves, M. und Janossy, G. (1972):

Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. -

Transplant. Rev., 11 : 87 - 130.

Greaves, M., Janossy, G. und Doenhoff, M. (1974):

Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens. -

J. Exp. Med., 140 : 1 - 18.

Guevara, J. (Jr.), Johnston, D.A., Ramagali, L.S., Martin, B.A., Capetillo, S. und Rodriguez, L.V. (1982):

Quantitative aspects of silver deposition in proteins resolved in complex polyacrylamide gels. -

Electrophoresis, 3 : 197 - 205.

Hamaguchi, H., Morito, F., Kondo, J., Fujii, K. und Kato, K. (1980):

Prominent increase in the amount of a cytosol protein in transformed fibroblasts and ascites hepatoma cells. -

Biochim. Biophys. Acta, 628 : 119 - 124.

Hamaguchi, H., Ohta, A., Mukai, R., Yabe, T. und Yamada, M. (1981):

Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 1. Detection of genetic variant polypeptides in PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes. -

Hum. Genet., 59 : 215 - 220.

Hamaguchi, H., Yamada, M., Noguchi, A., Fujii, K., Shibasaki, M., Mukai, R., Yaba, T. und Kondo, I. (1982 a):

Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 2. Genetic polymorphism of lymphocyte cytosol 64 K polypeptide. -

Hum. Genet., 60 : 176 - 180.

- Hamaguchi, H., Yamada, M., Shibasaki, M., Mukai, R., Yabe, T. und Kondo, I. (1982 b):
Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 3. Frequent occurrence of genetic variants in some abundant polypeptides of PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes. - Hum. Genet., 62 : 142 - 147.
- Hamaguchi, H., Yamada, M., Shibasaki, M. und Kondo, I. (1982 c):
Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: 4. Genetic polymorphism of cytosol 100 K polypeptide. - Hum. Genet., 62 : 148 - 151.
- Harris, H. (1975):
The principles of human biochemical genetics. - North-Holland Publishing Company, Amsterdam (sec.ed.).
- Haynes, B.F., Hemler, M., Cotner, T., Mann, D.L., Eisenbarth, G.S., Strominger, J.L. und Fauci, A.S. (1981):
Characterization of a monoclonal antibody (5E9) that defines a human cell surface antigen of cell activation. - J. Immunol., 127 : 347 - 351.
- Hemler, M.E., Brenner, M.B., McLean, J.M. und Strominger, J.L. (1984):
Antigenic stimulation regulates the level of expression of interleukin 2 receptor on human T cells. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 2172 - 2175.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1985):
Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. - Electrophoresis, 6 : 103 - 112.
- Iscoe, N.N. und Melchers, F. (1978):
Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of LPS-reactive B lymphocytes. - J. Exp. Med., 147 : 923 - 933.
- Kettman, J. und Lefkovits, I. (1984 a):
An attempt to assess the overall diversity of murine

T cells using two-dimensional gel electrophoresis. -
Eur. J. Immunol., 14 : 769 - 777.

Kettman, J. und Lefkovits, I. (1984 b):
Changes in the protein pattern of murine B cells
after mitogenic stimulation. -
Eur. J. Immunol., 14 : 778 - 781.

Klose, J. (1975):
Protein mapping by combined isoelectric focusing and
electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to
testing for induced point mutations in mammals. -
Humangenetik, 26 : 231 - 243.

Klose, J. und von Wallenberg-Pachaly, H. (1976):
Changes of soluble protein populations during orga-
nogenesis of mouse embryos as revealed by protein
mapping. -
Dev. Biol., 51 : 324 - 331.

Klose, J. und Feller, M. (1981):
Genetic variability of proteins from plasma membranes
and cytosols of mouse organs. -
Biochem. Genet., 19 : 859 - 870.

Klose, J. (1982):
Genetic variability of soluble proteins studied by
two-dimensional electrophoresis on different inbred
mouse strains and on different mouse organs. -
J. Mol. Evol., 18 : 315 - 328.

Klose, J., Willers, I., Singh, S. und Goedde, H.W. (1983):
Two-dimensional electrophoresis of soluble and struc-
ture-bound proteins from cultured human fibroblasts
and hair root cells. -
Hum. Genet., 63 : 262 - 267.

Kondo, I., Yamakawa, K., Shibasaki, M., Yamamoto, T. und
Hamaguchi, H. (1984 a):
Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-
dimensional gel electrophoresis: V. Genetic polymor-

phism of cytosol 31 k polypeptide. -
Hum. Genet., 66 : 244 - 247.

Kondo, I., Yamamoto, T., Yamakawa, K., Harada, S., Oishi, H., Nishigaki, I. und Hamaguchi, H. (1984 b):
Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: VI. Identification of esterase D in the two-dimensional gel electrophoresis patterns of cellular proteins. -
Hum. Genet., 66 : 248 - 251.

Kondo, I., Yamamoto, T., Yamakawa, K., Shibasaki, M. und Hamaguchi, H. (1985):
Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: VII. Genetic polymorphism of cytosol polypeptide with molecular weight of 38,000. -
Hum. Genet., 70 : 328 - 332.

Kondo, I., Harada, S., Shibasaki, M., Yamakawa, K., Yamamoto, T. und Hamaguchi, H. (1986):
Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis: VIII. Genetic polymorphism of cytosol polypeptide with molecular weight of 20,000. -
Hum. Genet., 72 : 303 - 306.

Laemmli, U.K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. -
Nature, 227 : 680 - 685.

Leavitt, J. und Kakunaga, T. (1980):
Expression of a variant form of actin and additional polypeptide changes following chemical-induced in vitro neoplastic transformation of human fibroblasts. -
J. Biol. Chem., 255 : 1650 - 1661.

Lemkin, P.F., Lipkin, L.E. und Lester, E.P. (1982):
Some extensions to the GELLAB two-dimensional electro-

phoretic gel analysis system. -

Clin. Chem., 28 : 840 - 849.

Leonard, W.J., Depper, J.M., Uchiyama, T., Smith, K.A.,
Waldmann, T.A. und Greene, W.C. (1982):

A monoclonal antibody that appears to recognize the
receptor for human T-cell growth factor; partial cha-
racterization of the receptor. -

Nature, 300 : 267 - 269.

Lester, E.P., Lemkin, P., Lipkin, L. und Cooper, H.L. (1981):

A two-dimensional electrophoretic analysis of protein
synthesis in resting and growing lymphocytes in vitro. -

J. Immunol., 126 : 1428 - 1434.

Lester, E.P., Lemkin, P. und Lipkin, L. (1982):

A two-dimensional gel analysis of autologous T and B
lymphoblastoid cell lines. -

Clin. Chem., 28 : 828 - 839.

Ling, N.R. und Kay, J.E. (1975):

Lymphocyte stimulation. -

North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford.

Lipkin, L.E. und Lemkin, P.F. (1980):

Data-base techniques for multiple two-dimensional po-
lyacrylamide gel electrophoresis analyses. -

Clin. Chem., 26 : 1403 - 1412.

Marshall, R.R., Raj, A.S., Grant, F.J. und Heddle, J.A.
(1983):

The use of two-dimensional electrophoresis to detect
mutations induced in mouse spermatogonia by ethyl-
nitrosourea. -

Can. J. Genet. Cytol., 25 : 457 - 466.

Mc Conkey, E.H., Taylor, B.J. und Phan, D. (1979):

Human heterozygosity: A new estimate. -

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 6500 - 6504.

Mc Conkey, E.H. (1982):

Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins. -

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 : 3236 - 3240.

Merril, C.R., Goldman, D. und Van Keuren, M.L. (1982):

Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. -

Electrophoresis, 3 : 17 - 23.

Miller, K. (1982):

Stimulation menschlicher Lymphozyten durch Alloantigene und Mitogene. Cytogenetische, immunologische und zellkinetische Untersuchungen. -

Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität München.

Müller, U., Maier, N., Gimelli, G. und Fraccaro, M. (1984):

Y-dependent polypeptides identified by two-dimensional gel electrophoresis of monozygotic XO and XY fibroblasts. -

Hum. Genet., 67 : 108 - 110.

Neckers, L.M. und Cossman, J. (1983):

Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by Il-2. -

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 3494 - 3498.

O'Farrell, P.H. (1975):

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. -

J. Biol. Chem., 250 : 4007 - 4021.

Price, M.R., Campbell, D.G., Robins, R.A., Blecher, T.E. und Baldwin, R.W. (1984):

Characteristics of the cell surface antigen, p 72, associated with a variety of human tumors and mitogen-stimulated T-lymphoblasts. -

FEBS LETTERS, 171 : 31 - 35.

Racine, R.R. und Langley, C.H. (1980 a):

Genetic heterozygosity in a natural population of *Mus musculus* assessed using two-dimensional electrophoresis. -

Nature, 283 : 855 - 857.

Racine, R.R. und Langley, C.H. (1980 b):

Genetic analysis of protein variations in *Mus musculus* using two-dimensional electrophoresis. -

Biochem. Genet., 18 : 185 - 197.

Rosenmann, E., Kreis, C., Thompson, R.G., Dobbs, M., Hamerton, J.L. und Wrogemann, K. (1982):

Analysis of fibroblast proteins from patients with Duchenne muscular dystrophy by two-dimensional gel electrophoresis. -

Nature, 298 : 563 - 565.

Schneider, W. und Klose, J. (1983):

Analysis of two-dimensional electrophoretic protein patterns using a video camera and a computer: I. The resolution power of the video camera. -

Electrophoresis, 4 : 284 - 291.

Shackelford, D.A. und Strominger, J.L. (1980):

Demonstration of structural polymorphism among HLA-DR light chains by two-dimensional gel electrophoresis. -

J. Exp. Med., 151 : 144 - 165.

Shackelford, D.A., Mann, D.L., Van Rood, J.J., Ferrara, G.B. und Strominger, J.L. (1981):

Human B-cell alloantigens DC1, MT1 and LB12 are identical to each other but distinct from the HLA-DR antigen. -

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 4566 - 4570.

Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J. und Greaves, M. (1981):

Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. -

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 4515 - 4519.
- Takeda, A., Waldron, J.A., Ruddle, N.H. und Cone, R.E.
(1983):
Analysis of normal and neoplastic lymphocyte surface-
labelled proteins by two-dimensional polyacrylamide
gel electrophoresis. -
Exp. Cell. Res., 148 : 83 - 93.
- Taylor, J., Anderson, N.L., Scandora, A.E., Willard, K.E.
und Anderson, N.G. (1982):
Design and implementation of a prototype human pro-
tein index. -
Clin. Chem., 28 : 861 - 866.
- Thorsud, A.K., Vatu, M.H. und Jellum, E. (1982):
Two-dimensional electrophoretic patterns of proteins
of normal mucosa, polyps and carcinomas of large in-
testine. -
Clin. Chem., 28 : 884 - 889.
- Tracy, R.P., Curie, R.M. and Young, D.S. (1982 a):
Two-dimensional gel electrophoresis of serum speci-
mens from a normal population. -
Clin. Chem., 28 : 890 - 899.
- Tracy, R.P., Curie, R.M., Kyle, R.A. and Young, D.S. (1982 b):
Two-dimensional gel electrophoresis of serum speci-
mens from patients with monoclonal gammopathies. -
Clin. Chem., 28 : 900 - 907.
- Trowbridge, I.S. und Omary, B. (1981):
Human cell surface glycoprotein related to cell pro-
liferation is the receptor for transferrin. -
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 , 3039 - 3043.
- Tyson, J.J. und Haralick, R.H. (1986):
Computer analysis of two-dimensional gels by a general
image processing system. -
Electrophoresis, 7 . 107 - 113.

- Uchiyama, T., Broder, S. und Waldman, T.A. (1981):
A monoclonal antibody (Anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells: I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+)cells. -
J. Immunol., 126 : 1393 - 1397.
- Van Eijk, R.V.W. und Mühlradt, P.F. (1981):
Carbohydrate-labelled glycoproteins as markers of human lymphocyte subsets stimulated with mitogen and alloantigen. -
Eur. J. Biochem., 115 : 23 - 28.
- Waldinger, D., Braun, A. und Cleve, H. (1985):
The two-dimensional pattern of cellular proteins from mitogen stimulated human peripheral blood lymphocytes. -
Electrophoresis, 6 : 605 - 613.
- Walton, K.E., Styer, D. und Gruenstein, E.I. (1979):
Genetic polymorphism in normal human fibroblasts as analysed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. -
J. Biol. Chem., 254 : 7951 - 7960.
- Waxdal, M.J. und Basham, T.Y. (1974):
B- and T- cell stimulatory activities of multiple mitogens from pokeweed. -
Nature, 251 : 163 - 164.
- Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V.P. und Hancock, R. (1981):
Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. -
Anal. Biochem., 118 : 197 - 203.

D a n k s a g u n g e n

Herrn Prof. Dr. H. Cleve, meinem hochverehrten Lehrer, danke ich für die Bereitstellung seines Forschungslabors. Sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine große Diskussionsbereitschaft, die vielen wertvollen Hinweise und seine moralische Unterstützung durch sein stets verständnisvolles Entgegenkommen trugen entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit bei. Dafür gilt ihm mein herzlicher und aufrichtiger Dank.

Herrn Prof. Dr. W. Gutensohn danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und viele anregende Diskussionen.

Allen Mitarbeitern unseres Institutes, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken, besonders Frau A. Brandhofer für die hilfreichen praktischen Hinweise und die freundschaftliche Zusammenarbeit in der Gewebekultur und Herrn Ruck für seine große Geduld beim Anfertigen der Photographien.

Den Mitarbeitern des Institutes für Immunologie danke ich vor allem für ihre stete Hilfsbereitschaft, mit der sie die Blutabnahmen für mich durchgeführt haben, und für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung des Filmentwicklungsgerätes.

Mein besonderer Dank gilt allen Blutspendern, ohne deren bereitwillige Mitarbeit diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Meinem lieben Freund Helmut danke ich für seine hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung der Abbildungen und meiner lieben Schwester Brigitte für die Durchsicht des Manuskripts.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danke ich für die Sachhilfe, mit der diese Arbeit unterstützt wurde (Cl 27 / 11 - 1-3).

L e b e n s l a u f

Dorothea Waldinger,	geboren am 17. April 1956 in Neuötting am Inn
1962 - 1966	Besuch der Volksschule in Fürsten- feldbruck
1966 - 1975	Besuch des Graf Rasso Gymnasiums in Fürstenfeldbruck
Sommer 1975	Abiturabschluß
1975 - 1980	Studium des Faches Biologie an der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Wintersemester 80/81	Abschluß der mündlichen Hauptprüfung für Diplom-Biologen
Oktober 1981 - Juni 1982.	Durchführung der Diplomarbeit am In- stitut für Anthropologie und Humange- netik der Universität München unter Leitung von Prof.Dr.H.Cleve:"Metaboli- sche Markierung der Plasmamembranpro- teine und -glykoproteine humaner lym- phoblastoider B-Zellen. Suche nach ge- schlechtsspezifischen Unterschieden."
Juli 1982	Diplom
seit Juli 1982	Durchführung der Dissertationsarbeit am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München unter Leitung von Prof.Dr.H.Cleve, während dieser Zeit als wissenschaft- liche Mitarbeiterin am Institut tätig.

